

Aus dem Institut für Anatomie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Expression und Funktion neuronaler Leitmoleküle im Hippokampus

Zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologe Andreas Steup

geb. am 21.12.1970 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:

Prof. Dr. Bernhard Ronacher

Gutachter :

1. Prof. Dr. Robert Nitsch
2. Prof. Dr. Peter-Michael Kloetzel
3. Priv. Doz. Dr. Bernd Heimrich

Datum der Promotion: 18.10.2001

Zusammenfassung

Die Semaphorine *Sema3A* und *Sema3C* sowie *Netrin-1* und deren Rezeptoren, die *Neuropiline* und *DCC* wurden in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich ihrer Expression und auf ihre funktionellen Eigenschaften bezüglich des Auswachsens von Axonen, die die intrinsischen und afferenten hippocampalen Projektionen bilden, untersucht.

Während die Expressionsmuster von *Sema3A* schon gut bekannt waren, wurde in der hier vorliegenden Arbeit die Expression des Rezeptors von *Sema3A*, *Neuropilin-1* (*NP-1*), untersucht. *NP-1* wird von Embryonaltag E17 an im entorhinalen Kortex, dem Subiculum und der hippocampalen Anlage exprimiert. Es konnte eine starke postnatale Expression von *NP-1* in der CA3-Region und eine schwächere Expression in der CA1-Region, dem Gyrus dentatus und dem entorhinalen Kortex gezeigt werden. Außerdem wurden in dieser Arbeit die Expressionsmuster von *Sema3C* und *Neuropilin-2* (*NP-2*) genauer analysiert. Etwa zum Zeitpunkt der Geburt (P0) wurde *Sema3C* im Gyrus dentatus und in der Cornu ammonis Region exprimiert. Der *Sema3C*-Rezeptor *Neuropilin-2* wurde zu diesem Zeitpunkt ebenso im Gyrus dentatus und CA3-Region, schwächer auch in der CA1-Region exprimiert. Es wurde keine Expression dieser beiden Faktoren im entorhinalen Kortex detektiert. In Kokulturstudien zwischen mit *Sema3A* bzw. *Sema3C* transfizierten Zellaggregaten und Explantaten aus den hippocampalen Subregionen wurden für spezifische Explantate ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Sekretion der Semaphorine und dem Auswachsen der jeweiligen Explantate in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix deutlich. *Sema3A* besitzt repulsive Eigenschaften auf Explantate vom Gyrus dentatus, der CA1- und der CA3-Region sowie dem

entorhinalen Kortex. Die Interaktion zwischen Sema3A und NP1 beeinflusst das Einwachsen bzw. die Terminierung entorhinaler Fasern in der Molekularschicht des Gyrus dentatus, indem Sema3A eine repulsive Barriere für einwachsende Fasern und Moosfasern, die in Richtung der CA3-Region auswachsen, darstellt. Sema3C besitzt repulsive Eigenschaften auf Fasern des medialen Septums und beeinflusst dadurch das Einwachsen dieser Fasern entlang der Cornu ammonis Region in den Hippokampus.

Weiterhin wurden in dieser Arbeit die Expressionsmuster von *Netrin-1* und *DCC* im Hippokampus sowie die funktionellen Eigenschaften von Netrin-1 untersucht. *Netrin-1* wird bereits zum Zeitpunkt E17 im Neokortex exprimiert, konnte im Hippokampus jedoch erst ab dem postnatalen Entwicklungsstadium P1 detektiert werden. Während im Gyrus dentatus nur ein schwaches und im entorhinalen Kortex kein Signal gefunden werden konnte, wird *Netrin-1* stark in der Cornu ammonis Region exprimiert. Der Rezeptor *DCC* wird dagegen schon früher in der Embryonalentwicklung, ab E15, diffus in der hippocampalen Anlage exprimiert. Ab P1 lassen sich diese Signale im Gyrus dentatus und in den CA1-CA3-Regionen unterscheiden. Von den untersuchten Explantaten der hippocampalen Region zeigte Netrin-1 nur auf die Fasern von Gyrus dentatus und CA3, welche die hippocampale Kommissur bilden, einen attraktiven Wachstumseffekt. Dies bestätigt Befunde aus Netrin-1- und DCC-defizienten Tieren, in denen die hippocampale Kommissur aufgrund des fehlenden axonalen Leitmoleküls bzw. seines Rezeptors nicht ausgebildet wird.

Abstract

In this work, the semaphorins *Sema3A* and *Sema3C* as well as *Netrin-1* and their receptors, the *neuropilins* and *DCC*, were investigated regarding their expression and functional properties on outgrowing axons, which are forming the intrinsic and afferent hippocampal projections.

Because of the already well known expression patterns of *Sema3A*, this work focused on the expression of the receptor of *Sema3A*, *NP-1*. From embryonic stage E17 on, *NP-1* is expressed in the entorhinal cortex, the subiculum and the hippocampal Anlage. A strong postnatal expression of *NP-1* in the CA3-region could be detected, while the expression pattern in the CA1-region, the dentate gyrus and the entorhinal cortex was weaker. Additionally, the expression patterns of *Sema3C* and *NP-2* were investigated in greater detail. At birth (P0), *Sema3C* was expressed in the dentate gyrus and the cornu ammonis region. The expression of its receptor *NP-2* could be detected at the same timepoint P0 in the dentate gyrus and the CA3-region and, less pronounced, in the CA1-region. There could not be detected any expression of *Sema3C* or *NP-2* in the entorhinal cortex. In functional coculture studies between with *Sema3A* or *Sema3C* transfected cell clusters and neuronal explants from subregions of the hippocampal formation, these factors were investigated for their influence on axonal outgrowth within a three-dimensional collagen gel matrix. *Sema3A* has repulsive properties on explants from the dentate gyrus, the CA1- and CA3- regions and the entorhinal cortex. In the resulting model, the interaction between *Sema3A* and *NP-1* influences the ingrowth and/or the termination of entorhinal fibers into the molecular layer of the dentate gyrus by a repulsive barrier formed by *Sema3A*. The same barrier also acts on mossy fibers to allow them to

grow only in direction of the CA3-region. Sema3C has repulsive properties on fibers from the medial septum and shapes the ingrowth of these fibers along the cornu ammonis region into the hippocampus.

Additionally, the expression patterns of *Netrin-1* and *DCC* and their functional properties in the hippocampus were investigated. *Netrin-1* is already expressed in the cortex at E17, although the onset of expression in the hippocampus is at P1. In the dentate gyrus, a weak signal could be detected, but no signal was found in the entorhinal cortex. In the cornu ammonis region, however, *Netrin-1* showed a strong expression signal. The Netrin-1 receptor *DCC* could be detected as early as E15 with a diffuse distribution in the hippocampal Anlage. From P1 on, these signals could be distinguished in the dentate gyrus and the CA1-CA3-regions. Netrin-1 showed attractive properties only on fibers from explants of the dentate gyrus and the CA3-region, which form the hippocampal commissure. These results confirm previous findings from *Netrin-1* and *DCC* deficient animals in which the absence of the hippocampal commissure was described.

Schlagwörter:

Semaphorin, Netrin, Entwicklung, Kokultur, Hippokampus, axonale
Leitmoleküle

Keywords:

Semaphorin, Netrin, development, co-culture, hippocampus, axon guidance
molecules

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Zielfindung von auswachsenden Neuronen	1
1.2	Leitmoleküle axonalen Wachstums	3
1.2.1	Semaphorine und Neuropiline	3
1.2.2	Netrine und seine Rezeptoren	11
1.3	Die hippokampale Formation der Ratte als Modell	16
1.3.1	Der Gyrus dentatus	16
1.3.2	Cornu ammonis	19
1.3.3	Der entorhinale Kortex	20
1.4	Fragestellung	22
2	Material und Methoden	23
2.1	<i>In situ</i> Hybridisierungen	23
2.1.1	Gewebepräparation	23
2.1.2	Vorbereitung der Kryostatschnitte für die <i>in situ</i> Hybridisierungen	23
2.1.3	Verwendung von Oligonukleotiden für die radioaktive <i>in-situ</i> -Hybridisierungen:	24
2.1.4	Verwendung von Riboproben	25
2.2	Zell- und Gewebekulturexperimente	26
2.2.1	Präparation von Gewebeexplantaten aus embryonalen Gehirnen:	26
2.2.2	Kokulturexperimente	27
3	Ergebnisse	29
3.1	Semaphorine	29
3.1.1	Semaphorine und ihre Rezeptoren werden während der Entwicklung in der hippokampalen Formation der Ratte exprimiert	29
3.1.2	Semaphorine und ihre Rezeptoren sind an der Entwicklung der hippokampalen Projektionen der Ratte als neuronale Leitmoleküle beteiligt	33

3.2	Netrin	36
3.2.1	Netrin-1 und sein Rezeptor DCC werden während der Entwicklung der hippocampalen Formation der Ratte exprimiert	36
3.2.2	Netrin-1 und sein Rezeptor DCC sind an der Entwicklung der hippocampalen Projektionen der Ratte als neuronale Leitmoleküle beteiligt	39
4	Diskussion	42
4.1	Die Semaphorine Sema 3A und 3C besitzen repulsive Eigenschaften auf verschiedene afferente hippocampale Projektionen	42
4.2	Netrin-1 wirkt als attraktiver Faktor für Fasern der hippocampalen Kommissur	46
4.3	Ein komplexes Netzwerk von neuronalen Leitmolekülen ist für die Entwicklung hippocampaler Projektionen verantwortlich	47
5	Zusammenfassung	52

WIDMUNG

für Mariza

Abkürzungsverzeichnis

Ach	Azetylcholin
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DCC	deleted in colorectal cancer
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
FCS	fötales Kälberserum
GABA	Gamma-Aminobutter Säure
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HBSS	Hanks gepufferte Kochsalzlösung
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MAM	Meprin, A-5 Protein und Rezeptorproteintyrosinphosphatase Mu
MEM	modifiziertes Eagle Medium
NGF	nerve growth factor
NT-3	Neurotrophin 3
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PFA	Paraformaldehyd

PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
RT	Raumtemperatur
SSC	Natriumchlorid/ Natrium-Tricitrat-Puffer

1 Einleitung

1.1 Die Zielfindung von auswachsenden Neuronen

Ramón y Cajal beschrieb erstmals den Wachstumskolben als terminale Struktur einer neuronalen Zelle (Ramón y Cajal, 1890). Er entwickelte Theorien über neurotrophe Faktoren, über die Mechanismen des axonalen Wachstums und schlug für die Wegfindung von Axonen einen chemotaktischen Mechanismus vor, durch den die Axone beim Auswachsen zu ihren spezifischen Zielgebieten geführt werden. Demzufolge werden die Wachstumskolben der Axone durch den Gradienten eines diffusiblen Faktors gelenkt, der vom Zielgebiet sezerniert wird (Ramón y Cajal, 1893). Neben sezernierten und diffusiblen Proteinen wurden auch membranständige Faktoren als Leitmoleküle axonalen Wachstums beschrieben (Goodman and Shatz, 1993; Goodman, 1996; Tessier and Goodman, 1996). Diese Leitmoleküle können sowohl attraktive als auch repulsive Eigenschaften haben. Gemeinsam definieren diese Faktoren die Regionen, die die Axone während ihrer Wegfindung passieren können sowie ihre Zielgebiete, in denen sie terminieren und synaptische Kontakte ausbilden. Die sezernierten Faktoren üben ihren Einfluß über größere Entfernungen aus und leiten dadurch die Axone durch das Gewebe. Die membranständigen Leitmoleküle wirken lokal und dienen vorwiegend der Kollateral- und Synapsenbildung. So wurden im trigeminalen System Faktoren beschrieben, die auch über größere Distanzen attraktiv wirken (Lumsden and Davies, 1986), ebenso in der Pons (Heffner et al., 1990; Sato et al., 1994). Im Rückenmark konnte gezeigt werden, daß die Bodenplatte einen attraktiven Faktor sezerniert, der kommissurale Axone zur Mittellinie leitet (Tessier et al., 1988). Für einige Faktoren, wie zum Beispiel die

Semaphorine und die Netrine, gilt, daß sie sowohl attraktive wie auch repulsive Eigenschaften besitzen können. Die jeweilige Wirkung eines Faktors hängt im wesentlichen von der Rezeptorausstattung des axonalen Wachstumskolbens sowie der intrazellulären Signaltransduktion ab.

Der neuronale Wachstumskolben ist ein komplexes, hoch dynamisches Zellelement. Er dient der Integration von Informationen über die attraktiven und repulsiven Moleküle, die den Wachstumskolben umgeben. Er wird in eine organellenreiche zentrale Region und eine organellenarme periphere Region unterteilt. In der peripheren Region werden die dynamischen Lamellipodien und Filopodien gebildet. Die durch Aktinfaserbündel stabilisierten fingerartigen Filopodien wachsen in verschiedene Richtungen aus und retrahieren bei repulsiver Umgebung. Die Lamellipodien zeichnen sich durch kurze, ungeordnete Aktinfasern aus, die netzartig verteilt sind und der Stabilisierung und Anheftung des Wachstumskolben im umliegenden Gewebe dienen (Mueller, 1999). Im Wachstumskolben befinden sich Rezeptoren, die die attraktiven oder repulsiven Signale von neuronalen Leitmolekülen an die zytosolisch gelegene Signaltransduktionskaskade weitergeben (Mueller, 1999). Die Eigenschaften von Mitgliedern zweier Genfamilien dieser Leitmoleküle, den Semaphorinen und den Netrinen, wurden in den letzten Jahren genauer untersucht.

1.2 Leitmoleküle axonalen Wachstums

1.2.1 Semaphorine und Neuropiline

Die Familie der Semaphorine bildet mit mindestens 30 Mitgliedern eine der umfangreichsten Gruppen von Leitmolekülen für axonales Wachstum. Charakteristisch für die Semaphorine ist eine 500 Aminosäuren lange Semaphorindomäne, die in Invertebraten und Vertebraten konserviert ist. Die Mitglieder der Invertebraten- und Vertebratensemaphorine umfassen sieben Klassen, die durch carboxyterminal zur Semaphorindomäne gelegene Domänen unterschieden werden. Die viralen Semaphorine bilden die achte Klasse der Genfamilie (Kolodkin et al., 1993; Mark et al., 1997; Semaphorin Nomenclature Committee, 1999). Die Semaphorine der Klassen 2 (Invertebraten) und 3 (Vertebraten) sind sezernierte Proteine, die der Klassen 1 (Invertebraten) und 4 bis 7 (Vertebraten) sind membranständige Proteine (Abb. 1). Die Semaphorine der Klassen 2, 3 und 4 und 7 haben im Anschluß an die Semaphorindomäne eine Immunglobulindomäne vom C2-Typ. Die Semaphorine der Klasse 7 sind durch Glykosylphosphatidylinositol (GPI) extrazellulär an der Membran verankert (Abb. 1). Die Vertreter der Klasse 1 und 6 besitzen carboxyterminal nur die Transmembrandomäne. Die Semaphorine der Klasse 5 besitzen als ein besonderes Merkmal im Anschluß an die Semaphorindomäne eine Wiederholungssequenz von sieben Typ 1 Thrombospondineinheiten, der die Transmembrandomäne folgt (Abb. 1). Die viralen Semaphorine umfassen zwei sezernierte Vertreter, die entweder eine verkürzte Semaphorindomäne (SEMAVA) oder eine zusätzliche carboxyterminale Ig-Domäne (SEMAVB) besitzen (Abb. 1).

Das erste Semaphorin wurde unter dem Namen Collapsin-1 (Sema3A) mit Hilfe eines Kollabierungsassaya für Wachstumkolben unter Verwendung von Zellmembranen aus Hühnengehirnen isoliert (Raper and Kapfhammer, 1990; Luo et al., 1993). Sema3A, ein sezerniertes Semaphorin der Klasse 3, wirkt als Leitmolekül, das die Wachstumsrichtung von Axonen beeinflusst. Die Sekretion und repulsive Aktivität von Sema3A auf Neurone der sensorischen Hinterwurzelganglien konnte mit Hilfe von Kokulturrexperimenten in einer Kollagenmatrix gezeigt werden (Messersmith et al., 1995; Püschel et al., 1995). Sema3A wird als nicht-diffusible, membranständige Vorform synthetisiert. Die sezernierte Domäne wird von einer Furin-ähnlichen Protease abgespalten. Außerdem muß Sema3A als Homodimer vorliegen, um biologisch aktiv zu sein (Abb. 2) (Adams et al., 1996; Klostermann et al., 1998).

Sema3A kann sowohl attraktiv wie auch repulsiv auf Wachstumskolben wirken. Während der repulsive Effekt für das axonale Wachstum von Hinterwurzelganglien oder entorhinalen Fasern in der Ratte eine Rolle spielt, ist eine attraktive Wirkung auf diese Axone bisher nur in Zellkulturrexperimenten nachgewiesen worden (Song et al., 1998). Die Richtungsänderung ist unabhängig von der extrazellulären $[Ca^{2+}]$ und wird durch cGMP oder Proteinkinase G (PKG) reguliert. Der repulsive Effekt von Sema3A kann durch die Aktivierung von PKG in einen attraktiven konvertiert werden (Song et al., 1998; Ming et al., 1999). Im Gegensatz dazu kann eine durch NT-3-induzierte Attraktion durch die Inhibierung von PKG in Repulsion umschaltet werden (Mueller, 1999).

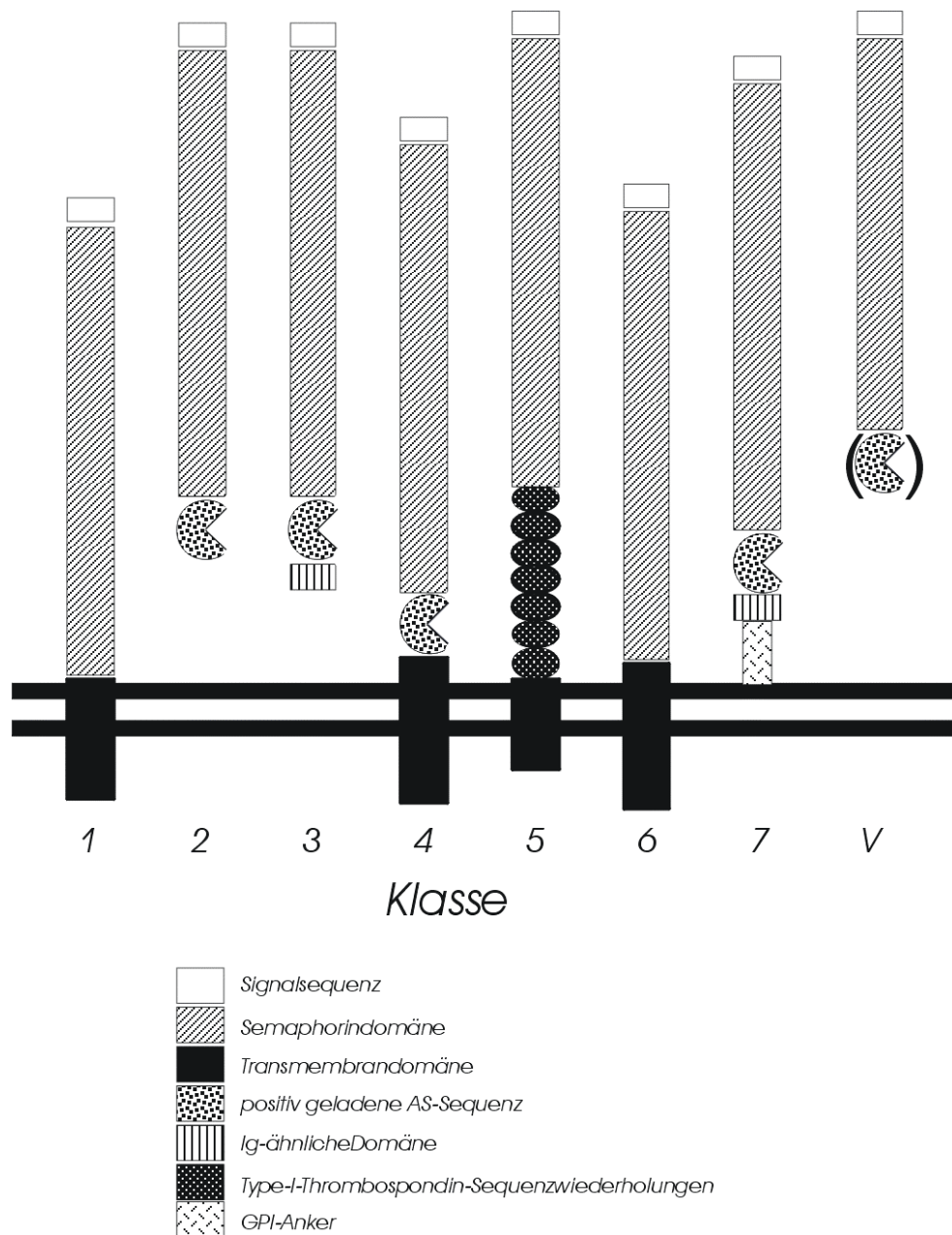


Abb. 1: Die Semaphorin-Familie neuronaler Leitmoleküle. Die Semaphorine definieren sich über eine 500 Aminosäuren lange homologe Region, die Semaphorindomäne, die in Invertebraten und Vertebraten konserviert ist. Die Mitglieder der Invertebraten- und Vertebratensemaphorine umfassen sieben Klassen; die achte Klasse beinhaltet die viralen Semaphorine (V). Die Semaphorine der Klassen 2 und 3 sind sezernierte Proteine, die der Klassen 1 und 4 bis 7 sind Transmembranproteine (Semaphorin Nomenclature Committee, 1999).

Die Expressionsmuster von *Sema3A* legen die Vermutung nahe, daß dieser Faktor auch eine Rolle bei dem Auswachsen verschiedener motorischer Neurone spielt. Die Bodenplatte des Rückenmarks leitet beispielsweise spinale und craniale motorische Axone durch einen repulsiven Mechanismus von der Mittellinie zu ihren Austrittspunkten (Guthrie and Pini, 1995) und rekombinantes *Sema3A* läßt Wachstumskolben aus ventralen Rückenmarksexplantaten kollabieren (Shepherd et al., 1996).

Die verschiedenen Semaphorine im Rückenmark von Hühnchen, Maus und Ratte zeigen differentielle Expressionsmuster. Bereits am Embryonaltag 9 (E9) der Entwicklung des Mäuseembryos läßt sich die Expression von *Sema5B* im Neuroepithelium entlang der Neuroaxis nachweisen (Adams et al., 1996). Kurz nachdem postmitotische Neurone auftreten, werden *Sema3A* und *Sema5A* und nach E11,5 die meisten murinen Semaphorine im Rückenmark exprimiert (Püschel et al., 1996). In den Embryonen von Maus und Huhn werden die Semaphorine *Sema3A* und *Sema3D* hauptsächlich im ventralen Teil des Rückenmarks exprimiert. Expression von *Sema3C* findet sich am ventralen Pol des Vorderhorns und überlappt teilweise mit der Expression von *Sema3A* (Püschel et al., 1996). Dies legt nahe, daß es für neuronale Subpopulationen spezifische repulsive Faktoren gibt, die das Einwachsen von sensorischen Afferenzen ins Rückenmark kontrollieren. Ein Faktor, der aufgrund seines Expressionsmusters dafür in Frage kommt, ist *Sema3A*. Dieser Faktor besitzt in Kokultur repulsive Eigenschaften auf NGF-stimulierte, jedoch nicht auf NT3-stimulierte Axone, die von E14 Maus- oder Ratten-Hinterwurzelganglien stammen (Fitzgerald et al., 1993; Messersmith et al., 1995; Püschel et al., 1996). Werden die Hinterwurzelganglien jedoch zu einem früheren Zeitpunkt entnommen (E12,5-E13,5), entfällt diese Spezifität, d.h. auch NT3-abhängige Axone werden von

Sema3A abgestoßen (Püschel et al., 1996). Daher muß für diesen Faktor angenommen werden, daß er sensible Afferenzen räumlich in verschiedene Regionen des Rückenmarks lenkt, und das Einwachsen von Kollateralen in das Rückenmark zu einem falschen Zeitpunkt unterbindet (Püschel et al., 1996).

Für insgesamt drei Semaphorine, Sema3A, Sema3C und Sema3F, die alle aus der gleichen Klasse von sezernierten Semaphorinen stammen, wurden Rezeptoren im Nervensystem der Säuger beschrieben (He and Tessier, 1997; Kolodkin et al., 1997). Zuerst wurde der Sema3A-Rezeptor, Neuropilin-1 (NP-1), beschrieben, ein Membranprotein, das ursprünglich mit dem Namen A5 als Oberflächenprotein von Zellen isoliert worden war. Es wurde im Neuropil von *Xenopus laevis*, Huhn und Maus nachgewiesen. NP-1 fördert axonales Wachstum und wurde später als Leitmolekül beschrieben (Takagi et al., 1991; Fujisawa et al., 1997). Sema3A bindet mit hoher Affinität an NP-1. Antikörper, die gegen die Ektodomäne von NP-1 gerichtet waren, blockierten die repulsive Aktivität von Sema3A auf sensorische Neurone der Ratte (He and Tessier, 1997; Kolodkin et al., 1997). Die Semaphorindomäne ist für die Bindung notwendig, und, nach ihrer Dimerisierung, auch ausreichend für die repulsive Aktivität, die von Ig- und basischen Aminosäure-Domänen potenziert wird (Feiner et al., 1997). Basierend auf diesen Daten wurde ein Zwei-Komponentenmodell des Semaphorinrezeptors vorgeschlagen, das aus einem Teil mit niedriger und einem Teil mit hoher Affinität bestehen soll (Feiner et al., 1997; Kobayashi et al., 1997). Der hochaffine Teil dieses Rezeptorkomplexes besteht demnach aus Neuropilin und einem noch unbekannten Partner. Dieses Modell wird durch die Tatsache unterstützt, daß Neuropiline nur einen sehr kurzen zytoplasmatischen Carboxyterminus besitzen, der keinerlei Homologie zu bekannten Signaltransduktionsdomänen aufweist.

Das zu NP-1 homologe Neuropilin-2 (NP-2) ist ein hochaffiner Rezeptor für Sema3C und Sema3F. Es bindet dagegen nur mit niedriger Affinität an Sema3A (Chen et al., 1997; Kolodkin et al., 1997). Die Neuropiline sind hoch konserviert und bestehen extrazellulär aus drei Domänen: a1/a2, b1/b2 und MAM (Abb. 2) (Fujisawa et al., 1997; He and Tessier, 1997; Kolodkin et al., 1997). Die a1/a2-Domänen besitzen Homologien zur CUB-Domäne (C1r/s-Komplementdomäne), während die b1/b2-Domänen Homologien mit den Koagulationsfaktoren V und VIII (FV/VIII) aufweisen.

Homologe Sequenzen zur MAM-Domäne wurden in der Tyrosinphosphatase Mu, A5/Neuropilin und Meprin, einer Metalloendopeptidase, gefunden (Fujisawa et al., 1997; He and Tessier, 1997; Kolodkin et al., 1997). Sowohl für die a1/a2- als auch die MAM-Domäne wird eine Rolle in Protein-Protein-Interaktionen vermutet (Bork and Beckmann, 1993). Neuropilin fördert neuronales Wachstum und induziert nach Transfektion die Zellaggregation von Fibroblastenzellen (Hirata et al., 1993). In diesen Experimenten wirkte Neuropilin als heterophiles, Kalzium-unabhängiges Zelladhäsionsmolekül, das über seine b1/b2 Domäne an Oberflächenmoleküle von L-Zellen bindet (Fujisawa et al., 1997). Sowohl die Semaphorindomäne als auch der Carboxyterminus interagieren mit NP-1 (Abb. 2) (Feiner et al., 1997; He and Tessier, 1997). An der Signaltransduktion sind Multimere aus NP-1 und NP-2 beteiligt. Experimente mit funktionellen Antikörpern gegen Neuropilin zeigten, daß die beiden Neuropiline Homo- bzw. Heterooligomere bilden können. Die repulsive Wirkung von Sema3A wird durch Homooligomere aus NP-1 vermittelt. Dagegen wird die Repulsivität von Sema3C und Sema3F von Homooligomeren, bestehend aus NP-2-Rezeptoren, vermittelt.

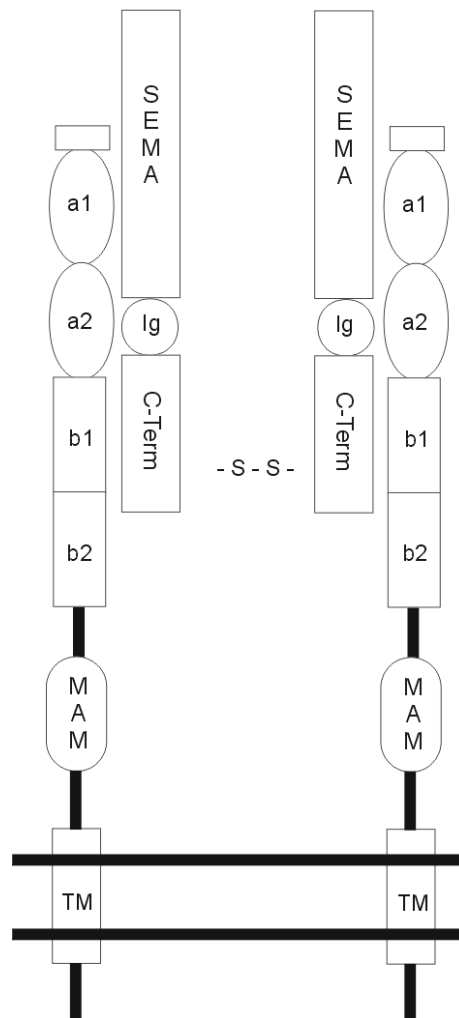


Abb. 2: Modell der Interaktion der sezernierten Klasse 3 Semaphorine mit ihren Rezeptoren, den Neuropilinen. Die Neuropiline 1 und 2 sind homolog aufgebaut und bestehen aus den a1/2-, b1/2-, der MAM- sowie einer Transmembrandomäne. Die Semaphorine 3A und 3C sind nur als Dimere biologisch aktiv.

Ob Heterooligomere aus NP-1 und NP-2 auch die repulsive Wirkung eines oder mehrerer Semaphorine übertragen können, ist jedoch unklar (Chen et al., 1997; Giger et al., 1998). Die für die Oligomerisierung wichtigen Abschnitte liegen zum Teil in der MAM-Domäne (Abb. 2) (Chen et al., 1998). Kürzlich ist es gelungen, einen direkten intrazellulären Bindungspartner von NP-1 zu identifizieren, welcher wahrscheinlich ein Teil des propagierten Rezeptorkomplexes ist (Feiner et al., 1997); (Kobayashi et al., 1997). Dieser Faktor wird NP-1-interagierendes Protein

(NIP) genannt und enthält eine zentrale PSD-95/Dlg/ZO-1-Domäne (PDZ) sowie eine carboxyterminale Acyl-Carrier-Domäne. Die drei letzten C-terminalen Aminosäuren (S-E-A-COOH, *single letter code*) von NP-1 sind hoch konserviert und für die Bindung an die PDZ-Domäne von NIP verantwortlich (Cai and Reed, 1999). Außerdem wurden verschiedene Mitglieder der Plexin-Familie als direkte Bindungspartner für die Neuropiline identifiziert, zuerst in *Drosophila melanogaster* (Winberg et al., 1998);(Tamagnone et al., 1999), dann auch in Vertebraten (Takahashi et al., 1999). Dabei zeigte sich, daß plexin-A1 nicht direkt an Sema3A bindet, jedoch an NP-1. Der dabei entstehende plexin-A1/ NP-1-Komplex besitzt eine höhere Sema3A-Bindungsaffinität als NP-1 alleine. Die carboxyterminale Domäne von plexin-A1 ist *in vitro* für die Signaltransduktion mitverantwortlich. Daher wird auch von plexin-A1 angenommen, daß es ein Teil des NP-1-Rezeptorkomplexes von Sema3A ist (Takahashi et al., 1999). Erst kürzlich wurde das Bild dieses Rezeptorkomplexes um ein weitere Komponente erweitert. Das membranständige Glycoprotein L1, ein Zelladhäsionsmolekül, geht eine stabile Bindung mit NP-1 ein, wobei die extrazellulären Domänen direkt aneinander binden (Castellani et al., 2000). L1 ist ein notwendiger Bestandteil des Rezeptorkomplexes, um die repulsive Wirkung von Sema3A weiterzuleiten. Die repulsiven Eigenschaften anderer Semaphorine, zum Beispiel Sema3C, sind jedoch von L1 unabhängig (Castellani et al., 2000).

1.2.2 Netrine und seine Rezeptoren

Die Netrine gehören zu einer Familie von neuronalen Leitmolekülen, die, ähnlich wie die Semaphorine, sowohl attraktive als auch repulsive Eigenschaften besitzen (Mueller, 1999). Mitglieder dieser Familie wurden unabhängig voneinander aus Vertebraten- und Invertebratengewebe isoliert. Schon in den siebziger Jahren wurden mehr als 30 Gene, die an Zell- und Axonmigration beteiligt sind, in Mutanten von *Caenorhabditis elegans* identifiziert (Brenner, 1974). Drei von diesen Genen, *unc-5*, *unc-6* und *unc-40* (*unc=uncoordinated*; für unkoordiniertes Wachstum der Wachstumskolben bei den Mutanten) sind bei der Leitung und Migration von Zellen und Axonen entlang der dorsoventralen Achse beteiligt (Hedgecock et al., 1990; Ishii et al., 1992; Wadsworth et al., 1996; Hedgecock and Norris, 1997). Während *unc-6* als sezerniertes Leitmolekül wirkt, sind *unc-5* und *unc-40* Rezeptoren (s.u.). Zwei *unc-6*-homologe Vertreter der Netrin-Familie, Netrin-1 und Netrin-2, wurden aus Gehirnen von *Gallus gallus* isoliert. Sie werden in der Bodenplatte des Rückenmarks bzw. dem ventralen Rückenmark exprimiert und wirken attraktiv auf kommissurale Axone des Rückenmarks (Kennedy et al., 1994; Serafini et al., 1994). Allen Netrinen ist ein Bereich mit Sequenzhomologie zu Laminin gemein. Laminin ist ein Bestandteil der Basalmembran, welcher das neuronale Wachstum stimuliert (Tessier and Goodman, 1996). Es besteht aus drei verschiedenen Ketten (alpha [A-Kette], beta [B1-Kette], gamma [B2-Kette]), die ein heterotrimeres Molekül bilden. Die Netrine besitzen Homologien zu zwei Domänen jeder Lamininkette, den Domänen V und VI. Die drei Lamininketten binden über die Domäne VI aneinander. Die Domäne V besitzt mehrere Abschnitte, die Homologien zu EGF aufweisen, und die möglicherweise als Bindungsstellen für Integrine oder andere Rezeptoren dienen. Am aminoterminalen Ende von Netrin befindet sich ein Signalpeptid, das von einer

Laminin B2-ähnlichen Domäne VI gefolgt ist. Daran schließen sich drei Laminin B2-ähnliche Domänen V an. Die carboxyterminale Sequenz der Netrine unterscheidet sich von Laminin. Dort befindet sich eine unc-6-ähnliche Domäne C, die bei neutralen pH-Werten positiv geladen ist (Ishii et al., 1992; Serafini et al., 1994). Die Netrine besitzen keine Transmembrandomäne (Abb. 3A), was auf ein sezerniertes Protein hinweist, das mit Komponenten der extrazellulären Matrix oder der Zelloberfläche interagiert (Serafini et al., 1994). Netrin kann möglicherweise über die zu Laminin homologe Domäne VI mit Laminin interagieren. Die Laminin B2-ähnliche Domäne V enthält EGF-ähnliche Sequenzwiederholungen (V-1, V-2, V-3), von denen jedoch nicht bekannt ist, ob sie auch als Bindungspartner für Rezeptoren auf der Zelloberfläche des Wachstumskolben dienen (Serafini et al., 1994; Wadsworth et al., 1996). Durch Analyse von Unc-6-Mutanten konnte in *Caenorhabditis elegans* festgestellt werden, daß die Domänen V-3 und C für Stabilität und Aktivität von Netrin verantwortlich sind, während Mutationen der Domäne VI zu einer Fehlverteilung von Netrin führten (Wadsworth et al., 1996). Die Netrin-Domäne V-2 ist notwendig für die dorsale, aber nicht ventrale Leitaktivität von Netrin, möglicherweise indem es mit dem Netrin-Rezeptor Unc-5 interagiert (Wadsworth et al., 1996).

Interessanterweise haben Netrine, ähnlich wie die Semaphorine, sowohl attraktive wie auch repulsive Eigenschaften. Netrine wirken attraktiv auf kommissurale Axone, die zur Mittellinie wachsen. Sobald diese Axone die Mittellinie überquert haben, übt Netrin-1 einen repulsiven Effekt auf sie aus. Außerdem ist Netrin-1 ein attraktives Leitmolekül für retinale Axone (Kennedy et al., 1994; Colamarino and Tessier, 1995a; Shirasaki et al., 1995; Deiner et al., 1997; de la Torre et al., 1997). In bilateral-symmetrischen Tieren ist die Bildung der kommissuralen Projektionen eines

der frühesten Ereignisse in der Entwicklung des Nervensystems. Die kommissuralen Projektionen verbinden die beiden Körperhälften und sind entlang der gesamten Längsachse des Tieres vorhanden. Entlang der Mittellinie befinden sich spezialisierte Zellen, die für die Orientierung der kommissuralen Fasern Leitmoleküle synthetisieren (Colamarino and Tessier, 1995b). Sowohl Vertebraten wie auch Invertebraten exprimieren Netrine entlang der Mittellinie (Kennedy et al., 1994; Harris et al., 1996; Mitchell et al., 1996; Wadsworth et al., 1996; Hedgecock and Norris, 1997). Verschiedene Leitmechanismen, die von *Caenorhabditis elegans* über *Drosophila melanogaster* bis zu Vertebraten konserviert sind, sind für das Wachstum auf die Mittellinie hin und das Überschreiten dieser verantwortlich. Netrin-1-abhängige Attraktion über große Entfernungen leitet die kommissuralen Axone zur Mittellinie hin (Tessier and Goodman, 1996), wogegen dieser Faktor nach dem Kreuzen repulsiv wirkt (Shirasaki et al., 1995). Netrine sind an der Zielfindung von verschiedenen Axonpopulationen in Vertebraten beteiligt. Netrin-1 übt auf spinale kommissurale Axone *in vitro* dieselbe attraktive Wirkung aus, wie die Bodenplatte des Rückenmarks (Kennedy et al., 1994). Die motorischen Axone des Nervus trochlearis werden dagegen von Netrin-1 abgestoßen, d.h. es liegt ein repulsiver Effekt vor (Colamarino and Tessier, 1995a).

Die Rezeptoren der Netrine werden in zwei Genfamilien zusammengefaßt. Eine Gruppe enthält die Rezeptoren der Unc-40/DCC Familie, zur zweiten Gruppe gehören die Rezeptoren der Unc-5-Familie, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll (Mueller, 1999). Die Rezeptoren der DCC-Familie (*deleted in colorectal cancer*) (Chan et al., 1996) zeichnen sich durch vier Immunoglobulin- und sechs Fibronectin-Typ-III-ähnliche Domänen als extrazellulären Anteil aus (Abb. 3B). Der zytoplasmatische Teil des Rezeptors ist wenig konserviert.

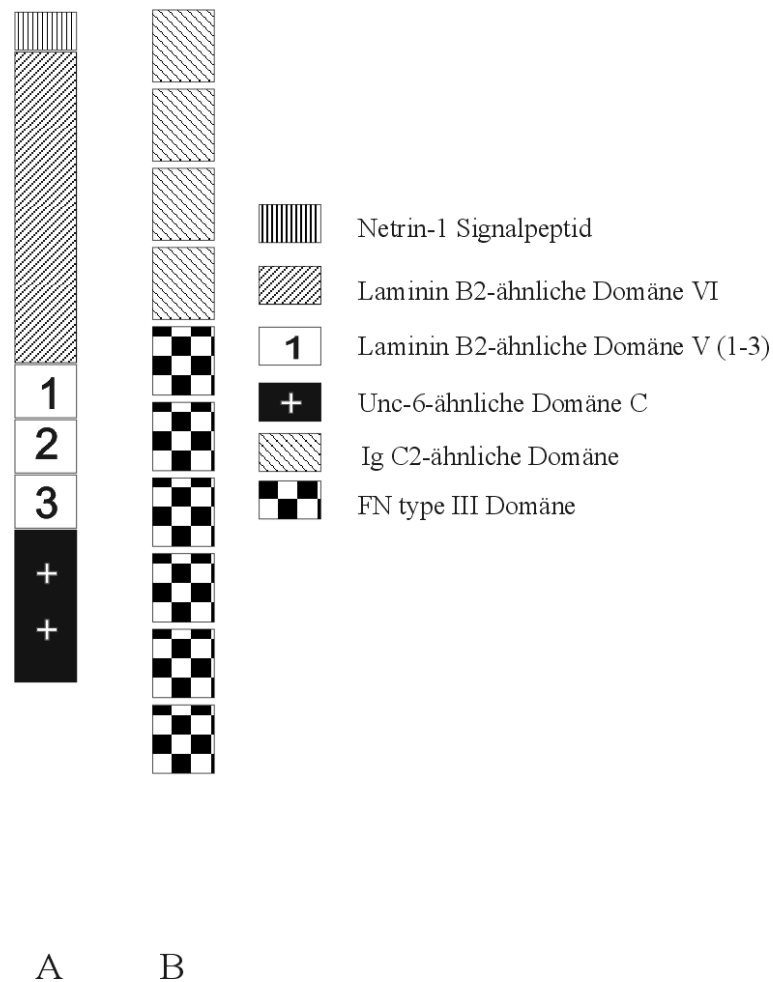


Abb. 3: Schematische Darstellung der Struktur des neuronalen Leitmoleküles Netrin-1 (A) und seines Rezeptors *deleted in colorectal cancer* (B; DCC).

Die DCC-Familie umfaßt Unc-40 in *Caenorhabditis elegans*, DCC und Neogenin in Vertebraten sowie *Frazzled* in *Drosophila melanogaster* (Chan et al., 1996; Keino et al., 1996; Kolodziej et al., 1996; Varela et al., 1997). DCC und Neogenin sind Netrin-1-bindende Proteine und Antikörper gegen DCC blockieren den wachstumsfördernden Effekt von Netrin-1 auf kommissurale Axone *in vitro* (Keino et al., 1996). Weitere Hinweise auf DCC als Netrin-1 Rezeptor wurden aus mutierten Mäusen ohne funktionellen Netrin-1-Rezeptor erhalten. Diese DCC^{-/-} Mäuse zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie Netrin-1-defiziente Tiere (Serafini et al., 1996; Fazeli et al., 1997). Die Anzahl der kommissuralen Axone, die die Bodenplatte im

Rückenmark erreichen, ist in DCC^{-/-} Mäusen stark reduziert. Weiterhin finden sich schwere Defekte im Gehirn der DCC^{-/-} Mäuse. Die Fasern der hippokampalen Kommissur und das Corpus callosum fehlen, außerdem ist die anteriore Kommissur reduziert (Fazeli et al., 1997). Im Rückenmark von Rattenembryonen wird DCC von kommissuralen Axonen exprimiert, und, in geringem Maße, auch von mesenchephalen motorischen Neuronen des Nervus trochlearis. Durch immunohistochemische Methoden wurde das DCC-Protein auf den Axonen und Wachstumskolben von kommissuralen Neuronen nachgewiesen. Die Koexpression von DCC/Neogenin und Unc-5 resultiert möglicherweise in einem molekularen Schalter, der eine attraktive Netrin-1-Reaktion des Wachstumskolben in eine repulsive Reaktion umschaltet (Hedgecock et al., 1990; Leung et al., 1992; Ackerman et al., 1997; Leonardo et al., 1997). Dieser molekulare Schalter wäre nach diesem Modell nicht nur von dem Rezeptortyp abhängig, sondern wird auch von den Konzentrationen verschiedener *second messenger* moduliert. Im Falle von Netrin-1 kann die Richtungsänderung der Neurone durch Entzug von Ca²⁺ blockiert werden (Mueller, 1999). Der kritische Faktor, der festlegt, ob die Reaktion attraktiv oder repulsiv ist, ist das Niveau der zytosolischen cAMP oder der Proteinkinase A-Aktivität (PKA). Die Inhibierung von PKA konvertiert einen attraktiven Effekt, der von Netrin-1, BDNF, NGF und ACh ausgelöst wird, in eine repulsive Wachstumsreaktion, während die Aktivierung von PKA, einen repulsiven Effekt, der durch Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG) ausgelöst wird, in Attraktion umkehrt (Song and Poo, 1999).

1.3 Die hippocampale Formation der Ratte als Modell

Die hippocampale Formation der Ratte wird morphologisch in sechs Hauptregionen unterteilt (Abb. 4). Dazu gehören: der Gyrus dentatus, der eigentliche Hippokampus, der in die Cornu ammonis Regionen eins bis drei unterteilt wird (CA1-CA3), das Subikulum, das Präsubikulum, das Parasubikulum, die oft zum subikulären Komplex zusammengefaßt werden, und der entorhinale Kortex. Der entorhinale Kortex projiziert über den Tractus perforans in den Gyrus dentatus, den Hippocampus und das Subikulum. Die Projektionen in den Gyrus dentatus und nach CA3 werden hauptsächlich durch Zellen der Schicht II des entorhinalen Kortex gebildet. Die Projektionen nach CA1 und in das Subikulum stammen dagegen von Zellen in der Schicht III. Die Axone der Körnerzellen, die Moosfasern, projizieren nach CA3 und sind Bestandteil von Kollateralen, die in der polymorphen Schicht des Gyrus dentatus terminieren. Die Zellen der polymorphen Schicht, vor allem die Mooszellen, bilden Assoziationsfasern, die an den proximalen Dendriten der Körnerzellen des gesamten Gyrus dentatus terminieren. Die Projektionen der Pyramidenzellen aus CA3 umfassen sowohl Kollaterale zu anderen CA3-Pyramidenzellen als auch die Schaffer-Kollateralen, die zu den Pyramidenzellen von CA1 projizieren als Teil der Assoziationsfasern (Abb. 5) (Amaral and Witter, 1995). Im folgenden soll die Architektur der für diese Arbeit wichtigsten Felder des Hippokampus, seiner typischen neuronalen Zellen und Projektionen, näher erläutert werden.

1.3.1 Der Gyrus dentatus

Der Gyrus dentatus besteht aus drei Schichten. Die am nächsten zur hippocampalen Fissur gelegene Schicht heißt Molekularschicht (Stratum moleculare) und enthält

Interneurone und Astrozyten, aber keine Projektionsneurone. Sie wird in drei Teile unterschieden, der äußeren, mittleren und inneren Molekularschicht.

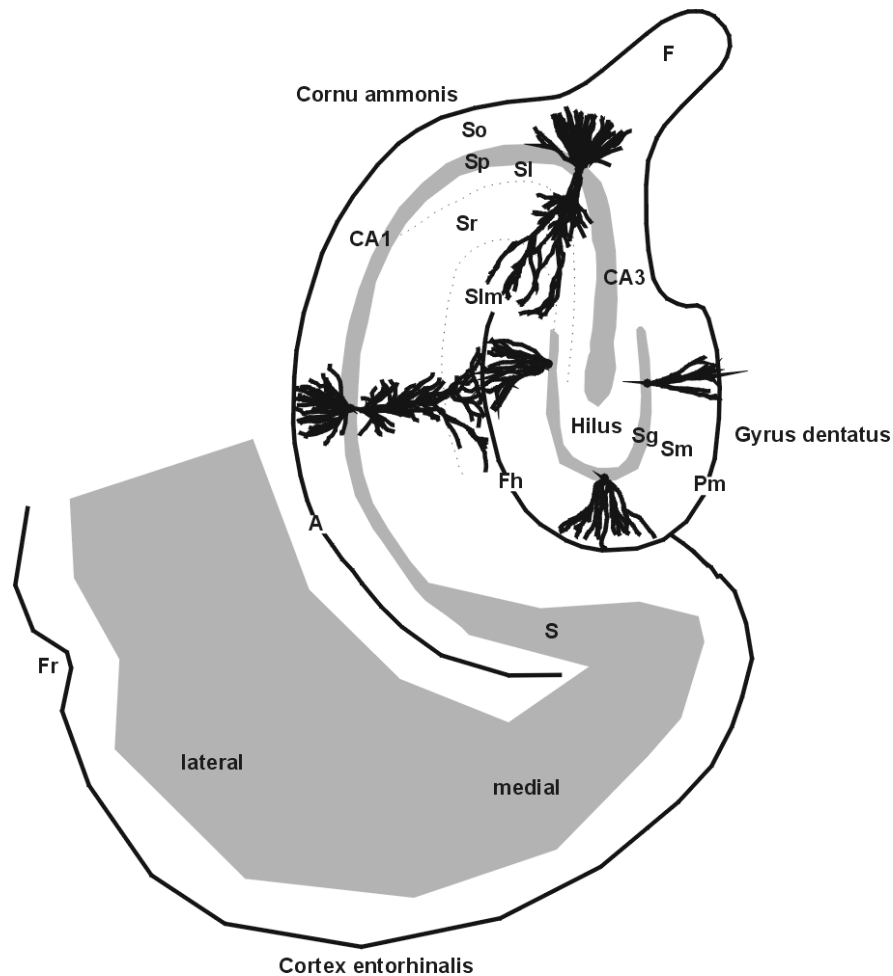


Abb. 4: Schematische Darstellung der hippocampalen Formation einer adulten Ratte in einem horizontalen Schnitt durch den temporalen Pol des Hippokampus mit anliegendem entorhinalen Kortex. Graue Flächen repräsentieren vor allem Zellkörper, weiße Flächen stellen die Gebiete dar, in denen hauptsächlich Zellfortsätze (Dendriten und Axone) zu finden sind. Im Cornu ammonis und Gyrus dentatus ist beispielhaft die Morphologie der Dendritenbäume von Projektionsneuronen gezeigt. A Alveus, CA1 Cornu ammonis Region 1, CA3 Cornu ammonis Region 3, F Fimbria, Fh Fissura hippocampi, Fr Fissura rhinalis, Pm Pia mater, S Subikulum, Sg stratum granulosum, Sl Stratum lucidum, SIm Stratum lacunosum moleculare, Sm Stratum moleculare, So Stratum oriens, Sr Stratum radiatum. (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. E. Simbürger.)

Die Molekularschicht besteht zum größten Teil aus den Dendriten der Körnerzellen (Projektionsneurone), Korbzellen (Interneuronen) und den axonalen Endigungen der entorhinalen, kommissuralen und septalen Afferenzen in dieser Schicht. Auf die Molekularschicht folgt die Körnerzellschicht (Stratum granulosum), die hauptsächlich aus den Somata der namensgebenden Körnerzellen aufgebaut ist. Beide Schichten geben dem Gyrus dentatus, abhängig von der Schnittebene, eine typische U-förmige Struktur, die die dritte Schicht, den Hilus, einfaßt (Abb. 4) (Amaral and Witter, 1995).

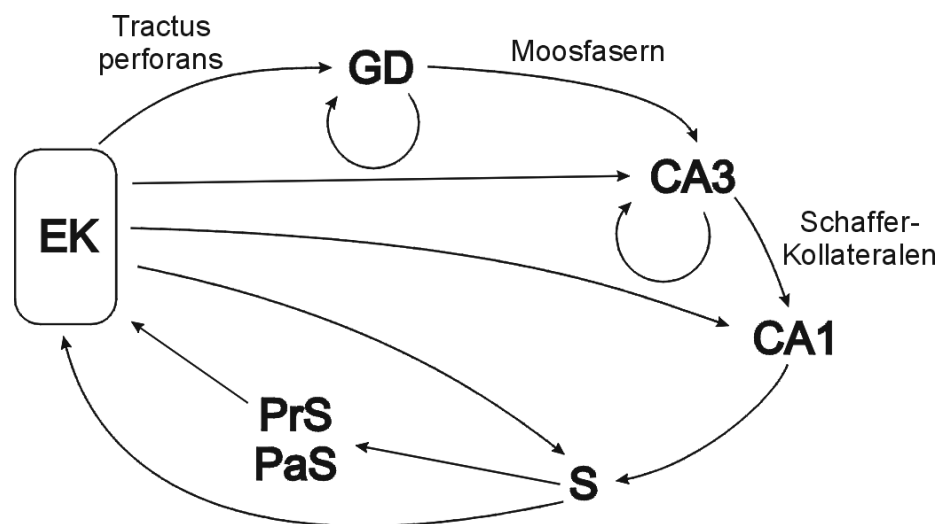


Abb. 5: Schematische Darstellung der wichtigsten Projektionen zwischen entorhinalem Kortex und Hippokampus sowie innerhalb des Hippokampus. Pfeile stellen die Projektionsrichtungen dar, die im Falle der hippokampalen Formation hauptsächlich unidirektional verlaufen. CA1 Cornu ammonis Region 1, CA3 Cornu ammonis Region 3, EK entorhinaler Kortex, GD Gyrus dentatus, PaS ParaSubikulum, PrS PräSubikulum, S Subikulum.

Im Hilus befindet sich eine Vielzahl verschiedener neuronaler Zelltypen. Die kommissuralen und Assoziationsfasern projizieren sowohl von der ipsi- als auch von der kontralateralen polymorphen Schicht zur inneren Molekularschicht des Gyrus dentatus. Ein Teil dieser Afferenzen stammen aus der CA3-Region (Amaral and

Witter, 1995). Zudem verlaufen die Moosfasern durch den Hilus nach CA3. Weitere, extrinsische, Afferenzen in die hippocampale Formation stammen aus dem medialen Septum. Diese Projektionen erreichen die hippocampale Formation hauptsächlich über die Fimbria/Fornix. Septale Fasern terminieren in allen Regionen des Hippokampus und, besonders ausgeprägt, in der Molekularschicht des Gyrus dentatus (Amaral and Witter, 1995).

1.3.2 Cornu ammonis

Das Cornu ammonis (Ammonshorn; CA1-3) ist laminar organisiert. Die am weitesten innenliegende Zellschicht ist das Stratum pyramidale, das im wesentlichen aus Pyramidenzellen besteht. Die Pyramidenzellen von CA3 bilden Kollaterale, die sowohl ipsi- als auch kontralateral in die Cornu ammonis-Region projizieren. Die kontralateral nach CA1-3 und dem Gyrus dentatus ziehenden Fasern werden kommissurale Projektionen genannt. Die ipsilateralen Projektionen von CA3 nach CA3, von CA3 in den Gyrus dentatus sowie vom Hilus in den Gyrus dentatus sind assoziativen Fasern. Die ebenfalls ipsilateralen Projektionen von CA3 nach CA1 werden Schaffer-Kollaterale genannt (Abb 5). Darauf folgt das Stratum oriens, welches durch den Alveus begrenzt wird. Durch eine zellfreie Schicht oberhalb der Pyramidenzellschicht von CA3, dem Stratum lucidum, verlaufen die Moosfasern. Auf das Stratum lucidum von CA3 und den Pyramidenzellschichten von CA1 folgt das Stratum radiatum, die auch suprapyramidale Region genannt wird (Abb. 4). Die am weitesten oberflächliche Region des Cornu ammonis ist das Stratum lacunosum moleculare (Abb. 4), in dem unter anderem die Fasern des Tractus perforans aus der Schicht III des entorhinalen Kortex terminieren (Amaral and Witter, 1995).

1.3.3 Der entorhinale Kortex

Der entorhinale Kortex, unterteilt in einen lateralen und einen medialen Anteil (Amaral and Witter, 1995), besteht wie die übrigen Kortextbereiche des Gehirns aus sechs Schichten (Abb. 4). Im folgenden wird nur auf die Schichten II und III eingegangen, die für die Projektionen in den Hippokampus wesentlich sind.

In Schicht II des entorhinalen Kortex befinden sich Sternzellen, Pyramidenzellen, multipolare und horizontale Zellen. Die Axone der Sternzellen sowie der Pyramidenzellen bilden den Teil des Tractus perforans, welcher in den DG projiziert. Die Axone der Pyramidenzellen in Schicht III projizieren nach CA1 und in das Subikulum (Abb. 5) und bilden Kollaterale in den Schichten I und III. Multipolare, fusiforme, horizontale, bipolare und Sternzellen senden ebenfalls axonale Fasern über den Tractus perforans in den Hippokampus.

Sowohl der Hippokampus als auch der Gyrus dentatus werden sehr stark vom entorhinalen Kortex innerviert. Der Tractus perforans terminiert im Cornu ammonis (Amaral and Witter, 1995). Die Axone der Zellen aus Schicht II und III ziehen durch die weiße Substanz zur alveolaren Oberfläche des Hippokampus und bilden dort das „*angular bundle*“ (Abb. 11A). Von dort ziehen sie durch das Subikulum und bilden den Tractus perforans, d.h. die Axone „perforieren“ das Subikulum. Die Fasern durchqueren die Pyramidenzellschicht des Subikulums und kreuzen die hippokampale Fissur, um in den Gyrus dentatus einzutreten, bzw. um sich in den Molekularschichten des Subikulums und des Hippokampus zu verzweigen. Die Fasern aus der Schicht II des entorhinalen Kortex, die in den Gyrus dentatus projizieren, terminieren ausschließlich in den äußeren zwei Dritteln der Molekularschicht, wo sie asymmetrische Synapsen ausbilden (Abb. 11A). Die Mehrzahl der synaptischen Kontakte wird mit den dendritischen Dornen („*spines*“)

der Körnerzellen geknüpft, einige auch mit Parvalbumin-/GABA-positiven Neuronen (Zipp et al., 1989). Fasern, die aus dem lateralen entorhinalen Kortex stammen, terminieren im äußersten Drittel der Molekularschicht des Gyrus dentatus, während die Fasern aus dem medialen entorhinalen Kortex in den darunter liegenden Teilen der mittleren Molekularschicht ihre synaptischen Kontakte ausbilden. Eine ähnliche Aufteilung der synaptischen Terminierungen findet sich auch in der CA3-Region, in der die lateralen entorhinalen Fasern im oberflächlich liegenden Teil des Stratum lacunosum moleculare (SLM) terminieren, die Fasern aus dem medialen entorhinalen Kortex jedoch in den tieferen Anteilen des SLM (Amaral and Witter, 1995). Die nach CA1 projizierenden Fasern stammen aus Schicht III und terminieren innerhalb des gesamten SLM von CA1. Mediale entorhinale Fasern ziehen in den proximalen Teil von CA1, während die lateralen entorhinalen Fasern weiter distal, an der Grenze zum Subikulum, terminieren (Amaral and Witter, 1995).

1.4 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Rolle die sezernierten Klasse 3 Semaphorine Sema3A und Sema3C sowie ihre Rezeptoren Neuropilin-1 und Neuropilin-2 in der Entwicklung der afferenten, efferenten und intrinsischen Projektionen des Hippokampus der Ratte spielen. Weiterhin wurde untersucht, welchen Einfluß Netrin-1 und sein Rezeptor DCC auf die Entwicklung dieses Systems haben. Dazu wurde zunächst die Expression der genannten Faktoren durch *in-situ*-Hybridisierungen mit radioaktiv markierten Sonden ermittelt. Anschließend wurden funktionelle *in vitro* Zellkulturstudien durchgeführt, bei denen Explantate neuronalen Gewebes mit Zellaggregaten, die die genannten Moleküle sekretieren, in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix ko-kultiviert wurden. Hierbei wurde überprüft, inwiefern die sezernierten Faktoren repulsiv oder attraktiv auf das Wachstum von neuronalen Fasern wirken.

2 Material und Methoden

2.1 *In situ* Hybridisierungen

2.1.1 Gewebepreparation

Ratten der Wistar Inzucht Linie wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der embryonalen und postnatalen Entwicklung dekapitiert¹, anschließend wurden die Gehirne entnommen und in der Gasphase von flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Am Kryostaten wurden bei -20 °C horizontale Schnitte (20µm) angefertigt und auf mit Aminoperoxysilan beschichtete Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden 5 min bei RT getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.1.2 Vorbereitung der Kryostatschnitte für die *in situ* Hybridisierungen

Zunächst wurden die Schnitte auf den Objektträgern mit 4% (w/v) PFA fixiert. Die weitere Behandlung unterschied sich im Hinblick auf die verwendeten radioaktiven Sonden. Für die Verwendung von markierten Oligonukleotiden wurden die Schnitte in 0,1 M PBS gewaschen und dehydriert. Für die Verwendung von radioaktiv markierter, *in vitro* synthetisierter, mRNA (Riboproben) wurden die Schnitte nach der Fixierung für 30 min in 0,1 M HCl bei RT inkubiert und in 0,1 M PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 30 min in 0,1 M Triethanolamine

¹ Die Organentnahme war laut Tierversuchsantrag T0115/97 genehmigt.

(pH 8,0) azetyliert, in 0,1 M PBS gewaschen und zuletzt dehydriert.

2.1.3 Verwendung von Oligonukleotiden für die radioaktive *in-situ*-Hybridisierungen:

Neuropilin-1 (GenBank: AF016296): es wurde ein *antisense*-Oligonukleotid mit der Sequenz 5' TCG GGA ACT CTG ATT GGA TGG TGC TGT CTA TAA TGG TTG GCT TCT 3', komplementär zu den Basen 2033 bis 2077 der cDNA verwendet.

Neuropilin-2 (AF016297): es wurde ein *antisense*-Oligonukleotid mit der Sequenz 5' AAA TCT TTG TCA TCC TCA AAG CTG CAG TTT TCC CCA CAC T 3', komplementär zu den Basen 2185 bis 2224 der cDNA verwendet.

DCC (RNU68725): es wurde ein *antisense*-Oligonukleotid mit der Sequenz 5' GCT TAC TTT GAT ACT CCT TGA ATT ACC CAC TTC CAG AGA GA 3', komplementär zu den Basen 2218 bis 2259 der cDNA verwendet.

Die Oligonukleotide (0,3 pmol) wurden gemäß den Herstellerangaben unter Verwendung von terminaler Transferase (Boehringer Mannheim, Deutschland) mit [α -³⁵S]dATP (DuPont NEN, Boston) radioaktiv endmarkiert. Für die Hybridisierungen wurden die markierten Sonden mit Hybridisierungsmix gemischt (0,3 pmol/ ml; 50% Formamid, 10 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,4), 2x SSC, 5 mM EDTA, 10% Dextransulfat, 5x Denhardts Lösung, 10 mM DTT, 2 mg tRNA). Die Hybridisierung erfolgte für 16 h bei 42 °C in einer feuchten Kammer. Nach dem Waschen (2x 30 min in 1x SSC bei 56 °C und 1x 5 min in 0,5x SSC bei RT) wurden die Schnitte dehydriert und für eine Woche einem Kodak X-OMAT AR Röntgenfilm ausgesetzt (Autoradiographie). Zur genaueren Analyse wurden die Schnitte mit Kodak NTB-2 Foto-Emulsion überschichtet ("dippen") und

2 Wochen bei 4 °C exponiert. Nach der Entwicklung (Kodak D19) wurden die Schnitte mit Toluidinblau gegengefärbt. Als Kontrolle wurden die *in-situ*-Hybridisierungen unter Zugabe von einem 50-fachen Überschuß an unmarkiertem Oligonukleotiden zur radioaktiv markierten Probe durchgeführt. Die Schnitte wurden gleich behandelt.

2.1.4 Verwendung von Riboproben

Für die Herstellung der *Sema3A*- und *Sema3C*-Riboproben wurde die Plasmide *pBK-CMVSemD* und *pBK-CMVSemE* (Püschel et al., 1995; Adams et al., 1997), welche die Sequenzen von *Sema3A* bzw. *Sema3C* enthalten, verwendet. Für die *Netrin-1* Riboprobe wurde der Vektor *pBK-CMVnetrin-1* (Varela et al., 1997), der die cDNA von *netrin-1* enthält, verwendet. Die Vektoren wurden mit den Restriktionsenzymen *SmaI* oder *SpeI* zur Linearisierung inkubiert. Die linearisierten Vektoren, die als Matrize für die Generierung von *sense*- bzw. *antisense*-Sonden dienten, wurden gemäß Herstellerangaben in einem Reaktionsansatz mit T3-RNA-Polymerase oder T7- RNA-Polymerase (Boehringer Mannheim, Germany) inkubiert, um unter Zugabe von [α -³⁵S]dUTP markierte *sense*- (T3) bzw. *antisense*-Sonden (T7) herzustellen. Die T7-generierten RNAs dienten als spezifische Probe, die T3-generierten als Kontrolle. Die Proben wurden anschließend mit DNaseI inkubiert, mit 1/10 Vol. 2 M NaOH hydrolysiert und mit 2/10 Vol. 1 M Essigsäure neutralisiert. Die Hybridisierung erfolgte für 16 h bei 52 °C in einer feuchten Kammer. Nach dem ersten Waschen (1 x 5 min in H₂O bei RT) wurden die Schnitte mit 20 µg/ml RNase-A in TNE Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 1mM EDTA) für 15 min bei 37 °C inkubiert. Das abschließende Waschen erfolgte: 1 x 5 min in H₂O bei RT,

2x 30 min in 1 x SSC bei 56 °C und 2 x 30 min in 0,1 x SSC bei 56 °C, 1 x 5 min in H₂O bei RT. Nach dem Dehydrieren wurden die Schnitte für eine Woche einem Kodak X-OMAT AR Röntgenfilm ausgesetzt (Autoradiographie). Zur genaueren Analyse wurden die Schnitte mit Kodak NTB-2 Foto-Emulsion überschichtet („dippen“) und 2 Wochen bei 4 °C exponiert. Nach der Entwicklung (Kodak D19) wurden die Schnitte mit Toluidinblau gegengefärbt.

2.2 Zell- und Gewebekulturexperimente

2.2.1 Präparation von Gewebeexplantaten aus embryonalen Gehirnen:

Schwangere Ratten der Wistar Inzucht Linie wurden zwischen den Zeitpunkten E19 und E21 der Entwicklung ihrer Embryonen mit einer Mischung aus 25% Ketavet, 6% Rompun und 2,5% Vetranquil in einer 0,9%igen NaCl-Lösung (2,5 ml/kg Körpergewicht i.p.) anästhesiert und dekapitiert. Die Embryonen wurden dem Muttertier entnommen, dekapitiert und das Gehirn entnommen². Die weitere Präparation fand in eiskaltem PBS oder HBSS statt. Von den Gehirnen wurden mit einem Vibratom in eiskaltem PBS 400 µm dicke horizontale Schnitte angefertigt. Anschließend wurde in eiskaltem HBSS von den Schnitten der Hippokampus und der benachbarte entorhinale Kortex abgetrennt. Der Hippokampus wurde in seine Felder (CA1, CA3 und Gyrus dentatus) aufgeteilt. Aus dem entorhinalen Kortex wurden Explante der Schichten II/III entnommen. Zusätzlich wurden aus E21 Gehirnen

² Die Organentnahme war laut Tierversuchsantrag T0115/97 genehmigt.

Explantate des medialen Septums präpariert.

2.2.2 Kokulturrexperimente

Kulturen von 293 Zellen (ATCC CRL 1573) wurden in 250 ml Kulturflaschen angezogen. Bei einer Wachstumsdichte von 75% auf der Oberfläche der Kulturflasche wurden sie transient mit einer Mischung aus 12 µg Plasmid DNA (Sema3A [*pBKFlagSemD*], Sema3C [*pBKFlagSemE*], (Püschel et al., 1995; Adams et al., 1997); netrin-1 [*pBKFlagnetrin-1*], zur Verfügung gestellt von A. W. Püschel) und 48 µl PerFect Lipid Pfx-4 (Invitrogen) transfiziert. Als Kontrolle diente das Plasmid *pBK-CMV*, das in gleicher Weise und Menge transfiziert wurde. Aus den transfizierten Zellen wurden Hängetropfenkulturen (Püschel et al., 1995) angelegt. Dazu wurden die Zellen trypsiniert und in 500 µl 10% FCS in DMEM Medium (GIBCO BRL) geerntet. 25 µl der Zellsuspension wurden auf die Deckel von 6-Loch-Kulturplatten pipettiert und über Kopf hängend über Kulturmedium für 16 h bei 37 °C inkubiert. Durch die Schwerkraft sammeln sich die Zellen in dem Tropfen und bilden ein Aggregat. Diese Zellaggregate wurden in eine drei-dimensionale Kollagen-Matrix eingebracht. Das dafür notwendige Kollagengel wurde aus Typ I Kollagen (aus Rattenschwanz; Sigma C7661) hergestellt, welches in 0,1 M Essigsäure mit einer Endkonzentration von 2 mg/ml gelöst wurde. Diese Kollagenlösung wurde mit MEM Medium (GIBCO BRL) gemischt und durch Zugabe von Rekonstituierungspuffer (2,2% NaHCO₃ in 0,8 M NaOH) neutralisiert. Die verschiedenen Explantate wurden in die Kollagenmatrix eingebracht und in unmittelbarer Nähe der Zellaggregate positioniert. Nach dem Auspolymerisieren des Kollagens (30 min bei 37 °C) wurde Kulturmedium hinzugefügt (Neurobasalmedium

mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 2% B27, 0,5 mM L-glutamine [GIBCO BRL], 10 μ M Cytosin-Arabinosid [SIGMA]). Die Kokulturen wurden für 2 Tage bei 35 °C und 4% CO₂ inkubiert. Als Kontrollen für die Expression und Wirkung der zu untersuchenden Faktoren wurden folgende Ko-Kulturen angelegt: Hinterwurzelganglien von E14 und Explantate des entorhinalen Cortex von E21 Ratten als Positivkontrolle für die funktionelle Expression von *Sema3A* (Püschel et al., 1995). Die auswachsenden Neurite dieser Ganglien sollten von *Sema3A* abgestoßen werden. Als Positivkontrolle für die funktionelle Expression *Sema3C* (abstoßender Effekt) wurden E13 sympathische Ganglien der Ratte benutzt (Püschel et al., 1995), für die funktionelle Expression von *Netrin-1* (attraktiver Effekt) wurden E13 Explantate der Deckplatte von Ratten verwendet (Serafini et al., 1996).

Die Effekte der sezernierten Faktoren Sema3A, Sema3C und Netrin-1 auf das Auswachsen der neuronalen Explantate wurden in jeweils drei unabhängig durchgeführten Experimenten untersucht. Zur Auswertung wurde das Gebiet, in dem das Auswachsen von Neuriten beobachtet wurde in eine proximale (dem Zellaggregat zugewandte) und eine distale (dem Zellaggregat abgewandte) Hälfte unterteilt. Das Auswachsmuster wurde als attraktiv eingestuft, wenn in der proximalen Hälfte des Explantates eine höhere Faserdichte als in der distalen Hälfte beobachtet wurde. Dagegen wurde das Auswachsmuster als repulsiv bewertet, wenn die Faserdichte in der proximalen Hälfte geringer war als in der distalen bzw. wenn keine Fasern in der proximalen Hälfte beobachtet werden konnten. Radiales Auswachsen wurde als gleiche Faserdichte in beiden Hälften des Explantates definiert. Die Wachstumseffekte wurden an einem Phasenkontrastmikroskop beobachtet und fotografisch dokumentiert. Die Daten wurden blind ausgewertet und in Tabelle 1 zusammengefaßt.

3 Ergebnisse

3.1 Semaphorine

3.1.1 Semaphorine und ihre Rezeptoren werden während der Entwicklung in der hippocampalen Formation der Ratte exprimiert

Die Expression des Sema3A-Rezeptors *Neuropilin-1* (NP-1) im Hippokampus wurde mittels radioaktiver *in-situ*-Hybridisierung untersucht. Vom embryonalen Entwicklungsstadium E17 an wurden starke Hybridisierungssignale in der hippocampalen Anlage und dem entorhinalen Kortex gefunden (Abb. 6A). Zum Zeitpunkt P0 waren die Expressionssignale von NP-1 stark im ausdifferenzierten Hippokampus in der Pyramidenzellschicht der CA3-Region und schwächer in der CA1-Region, der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus, dem Subiculum sowie den Schichten II und III des entorhinalen Kortex lokalisiert (Abb. 6B, E-H). Die Intensität des Hybridisierungssignals nahm zu P7 hin ab und war zu späteren Zeitpunkten nicht mehr detektierbar. Desweiteren wurde die Expression von *Sema3C* und seinem Rezeptor *Neuropilin-2* (NP-2) im Verlauf der Entwicklung des Hippokampus untersucht. Es wurde keine Expression von *Sema3C* vor Embryonaltag 15 (E15) in der hippocampalen Anlage beobachtet (Abb. 7A). Von E 17 an wurde *Sema3C* im Hippokampus exprimiert. Vom Stadium P1 an konnte *Sema3C* in den gut unterscheidbaren Regionen des Hippokampus, der Pyramidenzellschicht von CA1-3 und dem Gyrus dentatus detektiert werden (Abb. 7B).

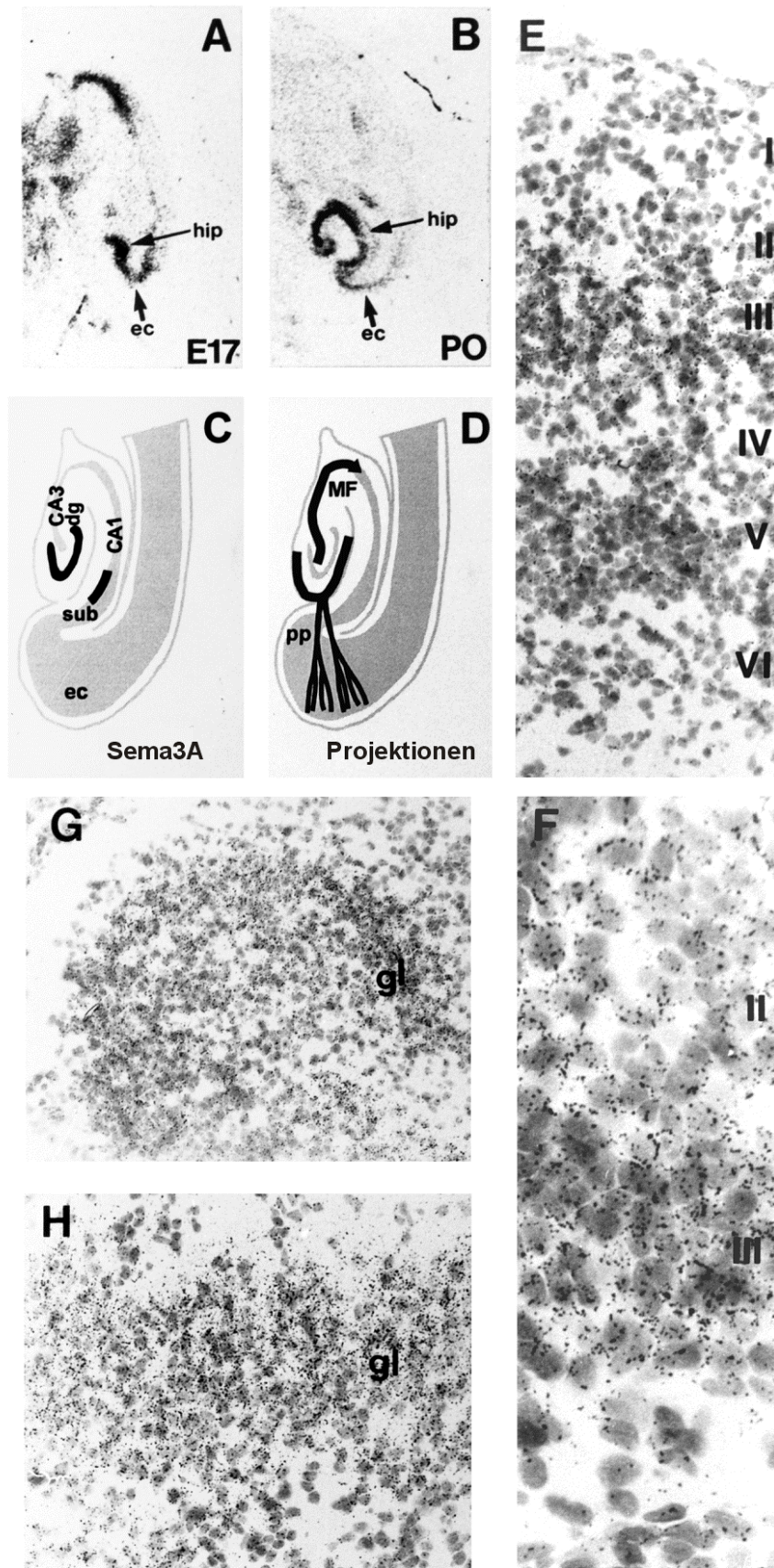


Abb. 6 (vorherige Seite): Expression von *Neuropilin-1* im entorhinalen Kortex und Hippokampus (A, B Autoradiogramm; E-H gedippte Schnitte), Diagramm der Expression von *Sema3A* im Hippokampus (C), schematische Darstellung der Anatomie des Tractus perforans und der Moosfaserprojektion (D). Das Expressionmuster von *Neuropilin-1* wurde durch radioaktive *in-situ*-Hybridisierung auf Kryostatschnittpräparaten von E17 (A) und P0 (B, E-H) Rattengehirnen visualisiert. Von E17 an wird *Neuropilin-1* im EC, Subiculum und der Anlage des Hippokampus exprimiert (A). Spezifische Signale wurden in den Schichten II und III des EC gefunden (E; höhere Vergrößerung in F). Zum Zeitpunkt P0 wurde ein starkes Expressionssignal in CA3 gefunden, während das Signal in CA1, Subiculum, DG und EC schwächer war (B). In der Körnerzellschicht des DG wurde Expression von *Neuropilin-1* gefunden (G; höhere Vergrößerung in H). Zum Vergleich: Skallora *et al.* (1998) fanden um P0 Expression von *Sema3A* in der Zielregion des Tractus perforans, der Molekularschicht des DG und an der Verbindungsstelle zwischen CA1 und Subiculum (C).

CA Cornu ammonis, dg Gyrus dentatus, ec entorhinaler Kortex, gl Körnerzellschicht, MF Moosfasern, pp Tractus perforans, sub Subiculum, hip Hippokampus. Vergrößerung: E=33x, F=130x, G=23x, H=46x.

Dieses Expressionsmuster bestand ohne Änderungen von postnatal bis zum adulten Stadium (Abb. 7C). Die Expression des Sema3C-Rezeptors *NP-2* war ab E17 detektierbar. Bei P1 konnte das Signal sowohl in der CA-Region als auch im Gyrus dentatus gefunden werden (Abb. 7D). Im entorhinalen Kortex konnte kein *NP-2*-Signal detektiert werden (Abb. 7E). Die Expression von *NP-2* im Gyrus dentatus und der CA-Region konnte bis zur spät-postnatalen Entwicklung (P19) gefunden werden (Abb. 7F).

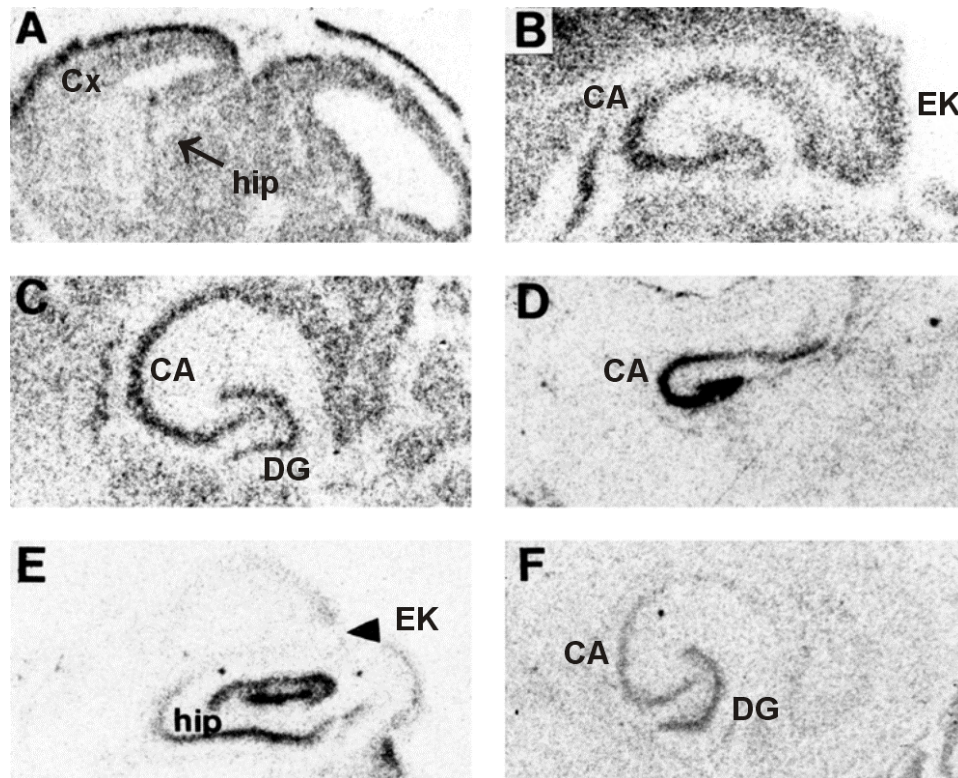


Abb. 7: Expression von *Sema3C* (A-C) und seinem Rezeptor *Neuropilin-2* (D-F) im Rattengehirn während der Entwicklung, durch radioaktive *in-situ*-Hybridisierung visualisiert.

Zum Zeitpunkt E15 der Embryonalentwicklung war die Expression von *Sema3C* im Kortex aber nicht in der hippokampalen Anlage detektierbar (A). Bei P1 war das Signal weiterhin im Kortex präsent und zusätzlich im DG und in der CA-Region des Hippokampus detektierbar (B). Im adulten Stadium waren weiterhin starke *Sema3C*-Expressionssignale im DG und CA1-CA3 detektierbar (C). In DG und CA3 wurde ab P1 ein starkes Hybridisierungssignal für *Neuropilin-2* gefunden, während das Signal in CA1 schwächer war (D). Im EK war zu diesem Zeitpunkt kein Expressionssignal detektierbar (E, Pfeilkopf). Dieses Expressionsmuster war bis in späte postnatale Stadien (P19) zu beobachten (F). A,D sind mediale sagittale Schnitte; E ist ein lateraler sagittaler Schnitt; B,C,F sind horizontale Schnitte; DG Gyrus dentatus, CA Cornu ammonis, Cx Kortex, EK entorhinaler Kortex, hip Hippokampus.

3.1.2 Semaphorine und ihre Rezeptoren sind an der Entwicklung der hippocampalen Projektionen der Ratte als neuronale Leitmoleküle beteiligt

Um die Effekte der sezernierten Semaphorine Sema3A und Sema3C zu untersuchen, wurden Kokulturen von Aggregaten von 293-Zellen (siehe II.2.2.), die entweder Sema3A oder Sema3C sezernierten, und neuronalen Gewebeexplantaten angelegt. Diese wurden in einer drei-dimensionalen Kollagenmatrix kultiviert. In den Kontrollkulturen (Abb. 9A₁, B₁, C₁; Abb. 10A₁, C, D) wurden die Zellaggregate mit dem Kontrollplasmid *pBK-CMV* transfiziert. Die neuronalen Explantate zeigten in diesen Kulturen radiales Auswachsen der Neuriten. Zellaggregate, die Sema3A-sezernierten, inhibierten dagegen das neuronale Wachstum von Axonen aus dem Gyrus dentatus, den CA1- und CA3-Regionen sowie aus dem entorhinalen Kortex auf der proximaler Seite der Explantate (Abb. 9A₂, B₂, C₂; Abb. 10A₂; Tab. 1). Das Wachstum der Neuriten auf der distalen Seite der Explantate wurde nicht von Sema3A beeinflusst. Die Neuriten von Explantaten aus dem medialen Septum zeigten keine Wachstumshemmung durch die Kokultur mit Sema3A-sekretierenden Zellaggregaten (Abb. 10B₂ and Tab. 1).

Im Gegensatz dazu hatte Sema3C eine repulsive Wirkung auf die auswachsenden Neuriten von Explantaten aus dem medialen Septum und der CA1-Region (Abb. 9B₃; Abb. 10B₃; Tab. 1). Verglichen mit den Kontrollkulturen (Abb. 9A₁, B₁, C₁; Abb. 10A₁, C, D), wurde kein Einfluß von Sema3C auf Explantate aus dem Gyrus dentatus, der CA3-Region und dem entorhinalen Kortex gefunden (Abb. 9A₃, C₃; Abb. 10A₃; Tab. 1).

Tab. 1 (nächste Seite): Differentielle Auswachsmuster neuronaler Explantate der hippocampalen Formation in der Kokultur. Semiquantitative Auswertung der differentiellen Auswachsmuster von Explantaten aus dem entorhinalen Kortex, dem Gyrus dentatus, dem Cornu ammonis und dem medialen Septum, die mit Sema3A-, Sema3C- oder Netrin-1 sekretierenden Zellaggregaten oder mit Kontrollzellaggregaten (mock) kokultiviert wurden. Die Zahlen repräsentieren die Anzahl der individuellen Explantate, die das jeweilige Auswachsmuster unter den untersuchten Kulturbedingungen zeigten. Die fett gedruckten Zahlen zeigen das bevorzugte Auswachsmuster unter den jeweiligen Kulturbedingungen an. Die Daten stammen jeweils aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Ko-Kulturexperimenten. Das Gebiet, in dem das Auswachsen von Neuriten beobachtet wurde, wurde in eine proximale (dem Zellaggregat zugewandte) und eine distale (dem Zellaggregat abgewandte) Hälfte unterteilt. Radiales Auswachsen bedeutet gleiche Faserdichte in beiden Hälften des Explantates. Repulsion bedeutet eine höhere Faserdichte in der distalen Hälfte des Explantates als in der proximalen Hälfte. Attraktion bedeutet eine höhere Faserdichte in der proximalen Hälfte des Explantates als in der distalen Hälfte. CA1, CA3 Cornu ammonis Regionen, DG Gyrus dentatus, EC entorhinaler Kortex

Tab. 1:

Explantat	Kokultur	radiales Auswachsen	Repulsion	Attraktion
EC	mock (n=33)	32	1	0
	Sema3A (n=18)	4	14	0
	Sema3C (n=28)	22	6	0
	Netrin-1 (n=24)	24	0	0
Explantat	Kokultur	radiales Auswachsen	Repulsion	Attraktion
DG	mock (n=11)	10	1	0
	Sema3A (n=9)	1	8	0
	Sema3C (n=17)	14	3	0
	Netrin-1 (n=12)	0	0	12
Explantat	Kokultur	radiales Auswachsen	Repulsion	Attraktion
CA1	mock (n=27)	26	1	0
	Sema3A (n=24)	5	19	0
	Sema3C (n=12)	0	12	0
	Netrin-1 (n=27)	26	1	0
Explantat	Kokultur	radiales Auswachsen	Repulsion	Attraktion
CA3	mock (n=23)	23	0	0
	Sema3A (n=16)	3	13	0
	Sema3C (n=22)	14	8	0
	Netrin-1(n=19)	0	0	19
Explantat	Kokultur	radiales Auswachsen	Repulsion	Attraktion
Septum	mock (n=30)	30	0	0
	Sema3A(=8)	8	0	0
	Sema3C (n=11)	0	11	0
	Netrin-1 (n=22)	22	0	0

3.2 Netrin

3.2.1 *Netrin-1* und sein Rezeptor *DCC* werden während der Entwicklung der hippocampalen Formation der Ratte exprimiert

Die Expressionsmuster von *Netrin-1* und *DCC* wurden durch radioaktive *in-situ*-Hybridisierung untersucht.

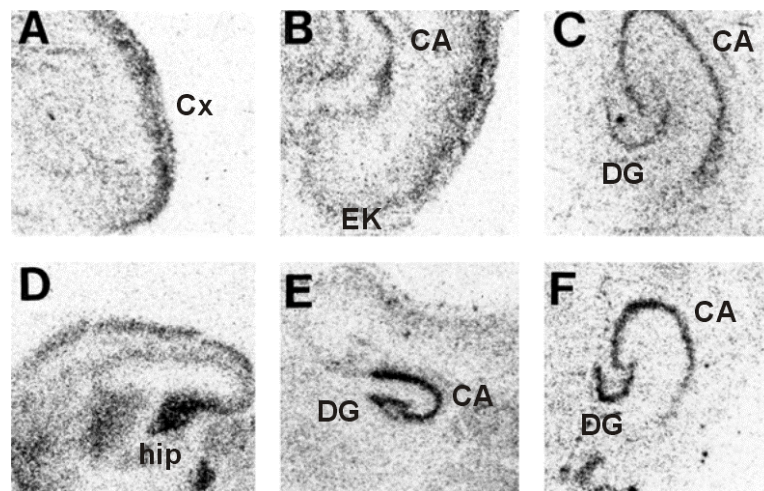


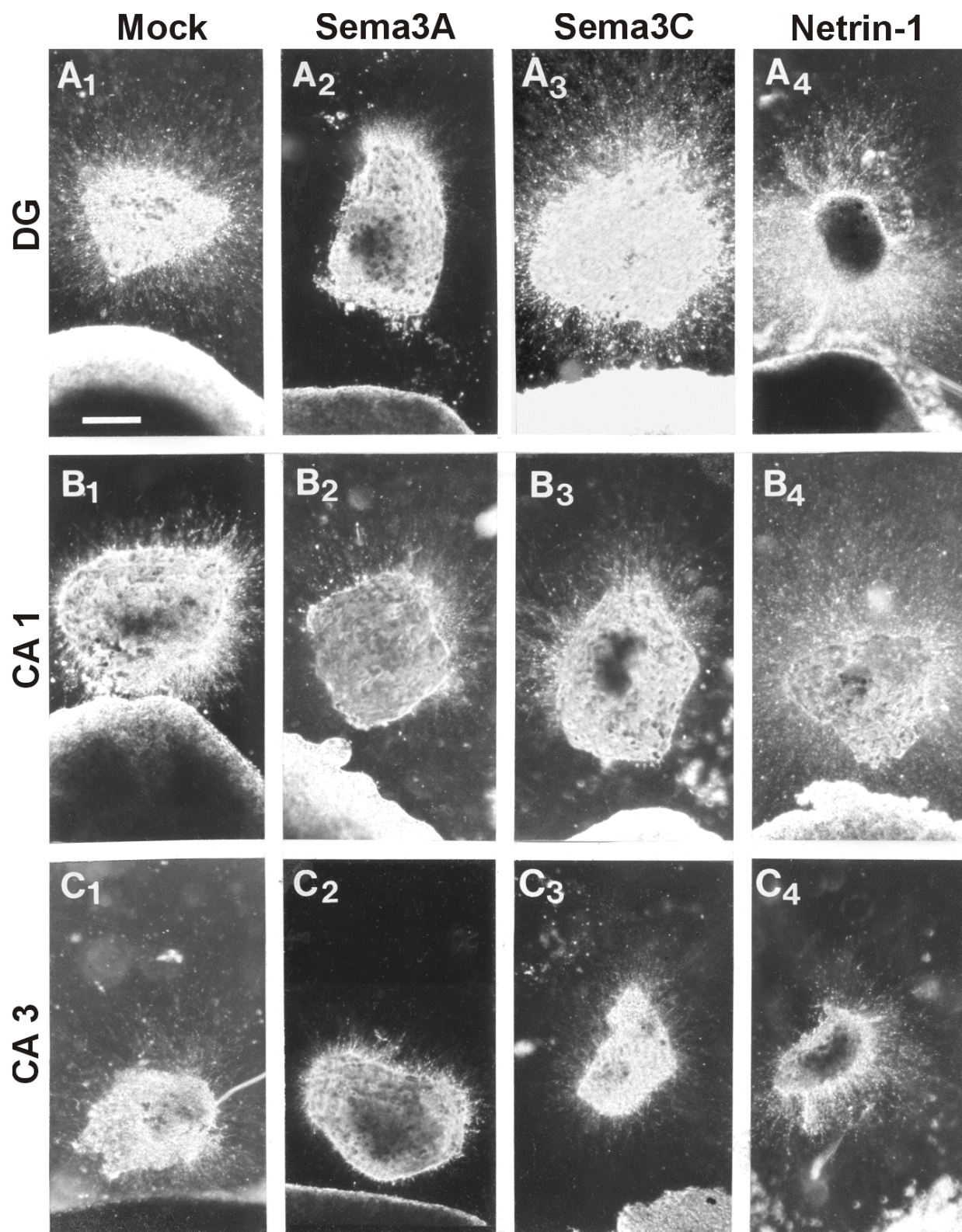
Abb. 8: Expression von *Netrin-1* (A-C) und seinem Rezeptor *DCC* (D-F) im Rattengehirn während der Entwicklung, durch radioaktive *in-situ*-Hybridisierung visualisiert.

Zum Zeitpunkt E17 der Embryonalentwicklung (A) wurde *Netrin-1* Expression im Kortex gefunden, während in der hippocampalen Anlage kein Signal detektierbar war. Zum Zeitpunkt P1 (B), wurde *Netrin-1* mRNA sowohl im Kortex als auch im Hippokampus lokalisiert, wobei das stärkste Signal im CA3 auftrat. Zu einem späteren Zeitpunkt der postnatalen Entwicklung (P8) wurde ein deutliches Expressionssignal in der CA1-3 Region beobachtet, während im DG ein schwächeres und im EC kein Signal detektiert werden konnte (C). Expression des Rezeptors *DCC* war ab E15 in der hippocampalen Anlage detektierbar (D). Ab P1 (E) wurden starke Expressionssignale im DG und CA1-CA3 gefunden, die bis P5 (F) detektiert werden konnten. A-C, F sind horizontale Schnitte; D,E sind saggitale Schnitte; CA Cornu ammonis, Cx Kortex, DG Gyrus dentatus, EK entorhinaler Kortex, hip Hippokampus.

An Embryonaltag E17 konnte die Expression von *Netrin-1* ausschließlich im Neokortex des Rattengehirnes festgestellt werden (Abb. 8A). Ab P1 wurde *Netrin-1* auch im Hippokampus, mit einem starken Signal in CA3 und schwächer im Gyrus dentatus, exprimiert, während im entorhinalen Kortex keine Expression detektierbar war (Abb. 8B). Zu späteren postnatalen Entwicklungsstadien (P8) wurde *Netrin-1* weiterhin in den CA-Regionen und dem Gyrus dentatus exprimiert (Abb. 8C). Dieses Expressionsmuster konnte bis zum adulten Stadium fort. Die Expression des Rezeptors *DCC* konnte ab E15 in der hippokampalen Anlage nachgewiesen werden (Abb. 8D). Nach der Entwicklung der hippokampalen Felder (P1) wurde *DCC* in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus und der Pyramidenzellschicht von CA3 detektiert (Abb. 8E). Dieses Expressionsmuster konnte bis P5 (Abb. 8F) beobachtet werden. Die Intensität des Expressionssignals nahm während der weiteren postnatalen Entwicklung ab. Im adulten Gehirn wurde *DCC* in den beschriebenen Regionen nur noch schwach exprimiert.

Abb. 9 (nächste Seite): Die neuronalen Leitmoleküle Sema3A, Sema3C und Netrin-1 beeinflussen differentiell das Auswachsen von Neuriten aus Hippokampus-Explantaten.

Explantate aus dem DG (A₁-A₄), der CA1-Region (B₁-B₄) oder der CA3-Region (C₁-C₄) von E19-E21 Rattenembryos wurden mit Zellaggregaten, die Sema3A (A₂, B₂, C₂), Sema3C (A₃, B₃, C₃) oder Netrin-1 (A₄, B₄, C₄) sekretieren oder mit Kontrollzellaggregaten (A₁, B₁, C₁) kokultiviert. Sema3A zeigte einen repulsiven Wachstumseffekt auf Axone von DG-, CA1- und CA3-Explantate (A₂, B₂, C₂), verglichen mit dem radialen Auswachsen von Neuriten bei den Kontrollkulturen (A₁, B₁, C₁). Sema3C hatte dagegen nur auf Explantate aus der CA1-Region einen repulsiven Effekt (B₃), aber nicht auf Explantate aus der DG- oder der CA3-Region (A₃, C₃). Netrin-1 zeigte einen attraktiven Wachstumseffekt auf Axone von DG- und CA3-Explantate (A₄, C₄). CA Cornu ammonis, DG Gyrus dentatus. Phasenkontrastaufnahmen. Skalierung: 100 µm.



3.2.2 Netrin-1 und sein Rezeptor DCC sind an der Entwicklung der hippocampalen Projektionen der Ratte als neuronale Leitmoleküle beteiligt

Zur Untersuchung der Wirkung des sezernierten Proteins Netrin-1 auf neuronale Explantate wurden mit diesem Faktor transfizierte Zellaggregate mit Explantaten der verschiedenen hippocampalen Regionen, des medialen Septums und des entorhinalen Kortex in eine Kollagenmatrix eingebettet. In den Kontrollkulturen wurde radiales Auswachsen der Explantate aller Subregionen beobachtet (Abb. 9A₁, B₁; C₁; 10A₁, B₁Tab.1). Die Explantate der CA1-Region, des entorhinalen Kortex und des medialen Septums wurden in ihrem Auswachsen von Netrin-1 nicht beeinflusst. Ihre Fasern zeigten radiales Wachstum (Abb. 9B₄; 10A₄, B₄). Dagegen zeigten die Fasern von Explantaten des Gyrus dentatus und der CA3-Region ein bevorzugtes Wachstum auf das Netrin-1-sekretierenden Zellaggregat hin (Abb. 9A₄, C₄; Tab. 1). Dies zeigte sich in einer höheren Anzahl und Dichte von Fasern auf der proximalen Seite des Explantats, während nur sich wenige Fasern auf der distalen Seite des Explantats befanden.

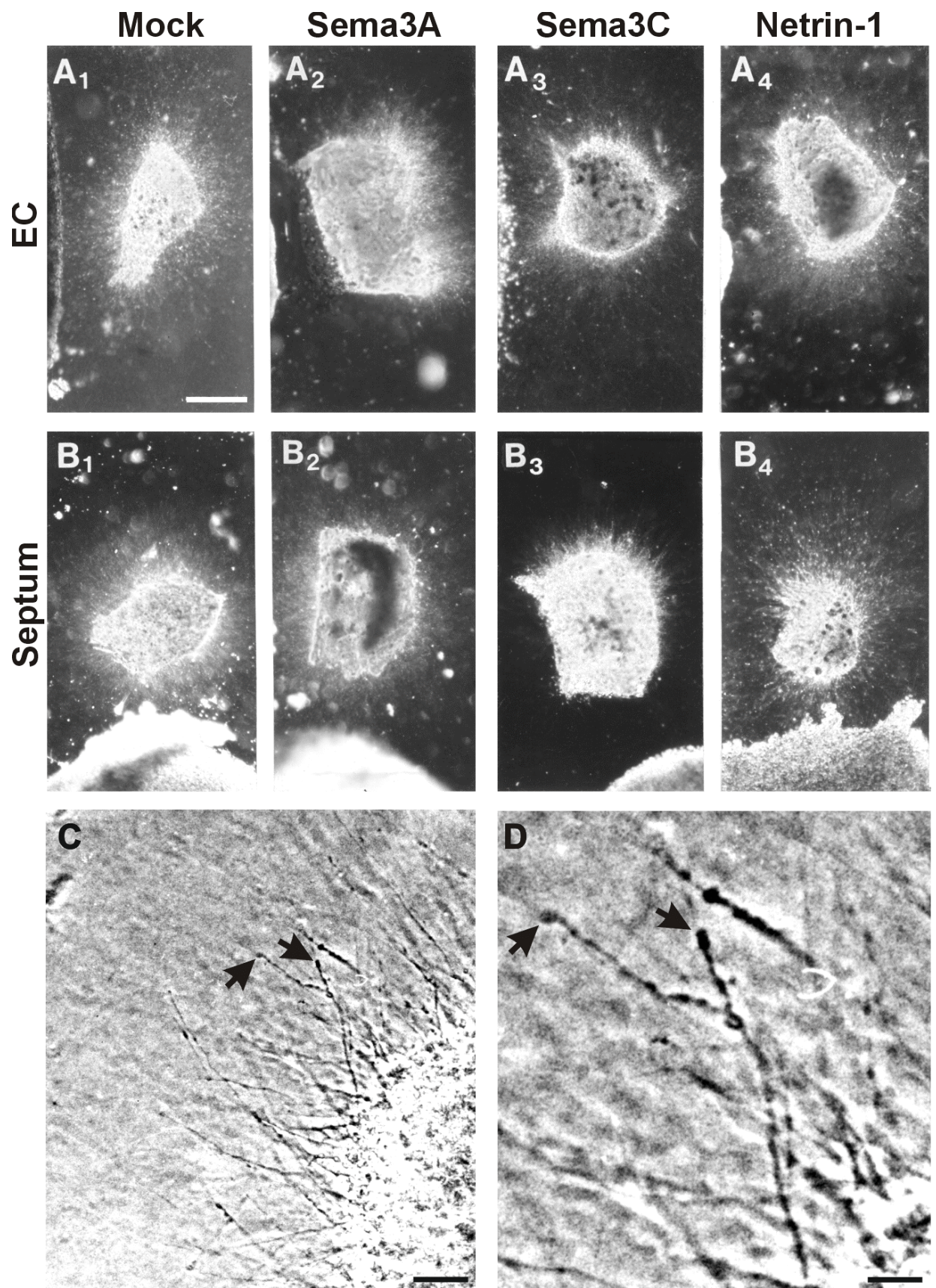


Abb. 10 (vorherige Seite): Die neuronalen Leitmoleküle Sema3A, Sema3C und Netrin-1 beeinflussen differentiell das Auswachsen von Neuriten aus Explantaten des EC und dem medialen Septum.

Explantate aus dem EC (A₁-A₄) oder medialen Septum (B₁-B₄) von E19-E21 Rattenembryonen wurden mit Zellaggregaten, die Sema3A (A₂, B₂), Sema3C (A₃, B₃) oder Netrin-1 (A₄, B₄) sekretieren oder mit Kontrollzellaggregaten (A₁, B₁) kokultiviert. Sema3A zeigte, im Vergleich zur Kontrolle (A₁), einen repulsiven Wachstumseffekt auf Axone des EC (A₂). Weder Sema3C (A₃) noch Netrin-1 (A₄) besaßen einen Einfluß auf das radiale Auswachsen von EC-Neuriten. Sema3C zeigte repulsive Wachstumseffekte auf Fasern des medialen Septums (B₃), während weder Sema3A noch Netrin-1 einen Einfluß auf das radiale Auswachsen der Neuriten besaß (B₂, B₄). In (C) sind auswachsende Axone von EC-Explantaten gezeigt, die mit Kontrollzellaggregaten kokultiviert wurden. In (D) ist eine höhere Vergrößerung von (C) gezeigt. Die Pfeile zeigen die Wachstumskolben. CA Cornu ammonis, EC entorhinaler Kortex, DG Gyrus dentatus. Phasenkontrastaufnahmen. A,B: Skalierung: 100 µm. C. Skalierung: 10µM. D: Skalierung: 30µM

4 Diskussion

Die Zielfindung von auswachsenden Neuronen ist für die Ontogenese des Gehirns ein wichtiger Vorgang. Nur bei einer korrekten Verschaltung der Gehirnareale durch die axonalen Bahnen ist die Funktionalität des Gehirns gewährleistet. In der vorliegenden Arbeit wurden der Einfluß verschiedener Moleküle auf die Wegfindung von afferenten, efferenten und intrinsischen Fasersystemen der hippocampalen Formation untersucht. Dazu wurden die Expressionsmuster und funktionellen Eigenschaften von Sema3A, Sema3C und Netrin-1 sowie die Expressionsmuster ihrer Rezeptoren ermittelt.

4.1 Die Semaphorine Sema 3A und 3C besitzen repulsive Eigenschaften auf verschiedene afferente hippocampale Projektionen

In den äußeren Molekularschichten des Gyrus dentatus terminieren Fasern des Tractus perforans (Abb. 11A). Diese Fasern innervieren die äußere Molekularschicht des Gyrus dentatus in einem dichten Band und sind deutlich abgegrenzt zu den Terminationszonen der kommissuralen und Assoziationsfasern (Super and Soriano, 1994). Hippokampale Regionen, die vom Tractus perforans während des Einwachsens in den Hippokampus vermieden werden, exprimieren *Sema3A*. Die Expression von *Sema3A* konnte in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus und an der Grenze zwischen Subiculum und CA1 nachgewiesen werden (Skaliora et al., 1998). Die Expressionsmuster des Sema3A-Rezeptors *Neuropilin-1* sowie die repulsive Wirkung dieses Semaphorins auf Explantate aus dem entorhinalen Kortex weisen auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen Sema3A und der

Ausbildung des Tractus perforans hin (Steup et al., 1999). Die Expression von *Sema3A* in der inneren Molekularschicht des Gyrus dentatus hat nach diesem Modell einen repulsiven Effekt auf einwachsende entorhinale Fasern des Tractus perforans, welche den entsprechenden Rezeptor *Neuropilin-1* exprimieren. Dadurch wird die innere Molekularschicht zur repulsiven Barriere für einwachsende Fasern, die sich in der äußeren Molekularschicht verzweigen und synaptische Kontakte ausbilden (Abb. 11A). Die Expression von *Sema3A* an der Verbindungsstelle zwischen Subiculum und CA1 (Skaliora et al., 1998) hat möglicherweise die Funktion, die ipsi- und kontralateral projizierenden entorhinalen Fasern in Richtung auf die Pyramidenzellschicht zu leiten (Abb. 11A) (Deller et al., 1996). Zusätzlich konnte durch Bindungsstudien mit Sema3A, das mit alkalischer Phosphatase gekoppelt wurde, die Verteilung von Neuropilin-1 in den Terminationszonen extrinsischer Afferenzen gezeigt werden³. Dies war besonders in den Molekularschichten des Gyrus dentatus, dem Stratum lacunosum moleculare, dem Stratum oriens und der Fimbria sowie den Moosfasern der Fall. *Neuropilin-1* wird in den Molekularschichten des Gyrus dentatus und in den CA-Regionen sowie den Moosfasern exprimiert (Kawakami et al., 1996; Guthrie and Pini, 1995). Axone von Explantaten aus diesen Regionen wurden durch die repulsive Wirkung von Sema3A in den Zellkulturexperimenten abgestoßen. Explantate aus dem medialen Septum wurden dagegen weder in repulsiver noch in attraktiver Weise in ihrem Wachstumsmuster von Sema3A beeinflusst. Neben der Funktion als Terminationszone für den Tractus perforans, wirkt die Molekularschicht

³ Diese Experimente wurden von Fr. Marion Lohrum, Frankfurt/Main, durchgeführt (Steup et al., 2000).

möglicherweise auch als repulsive Barriere für die Moosfasern, um sie zur CA3-Region zu leiten (Abb. 11A). Durch den Wegfall dieser repulsiven Barriere nach der Denervierung des Gyrus dentatus können Moosfasern in die Molekularschicht einwachsen (Frotscher and Zimmer, 1983). Studien mit dem anterograd transportierten lipophilen Farbstoff DiI, die an fixierten Gehirnen von *Sema3A*^{-/-} Mäusen durchgeführt wurden (*Tracer*-Studien), zeigten, daß sich auch der Tractus perforans und die Moosfaserprojektion ohne mit dieser Methode detektierbaren Veränderungen entwickeln (T. Skutella, unpublizierte Beobachtungen). Außerdem entwickeln sich weitere Projektionen, zum Beispiel die thalamokortikalen und die basalen Vorderhirnprojektionen, in *Sema3A*^{-/-} Mäusen normal (Catalano et al., 1998). Dies bedeutet, daß Sema3A nicht der ausschließliche Faktor ist, der an der Ausbildung dieser Projektionen beteiligt ist.

Die Kokulturstudien zeigen, daß Sema3C, ähnlich wie Sema3A, als neuronales Leitmolekül im Hippokampus wirken kann. Sema3C läßt in der Zellkultur auswachsende Fasern aus Explantaten des medialen Septum kollabieren. Auf entorhinale, CA3- sowie Gyrus dentatus-/ Hilus-Fasern hatte Sema3C dagegen keinen Einfluß. Die Transkripte von *Sema3C* und *Neuropilin-2* wurden in topographisch abgegrenzten Gebieten des Hippokampus lokalisiert. Expression von *Sema3C* wurde in der Pyramidenzellschicht der CA-Region gefunden. Die Rezeptorbindungsstudien mit Sema3C, das mit alkalischer Phosphatase gekoppelt wurde, (AP-Sema3C) zeigen die Anwesenheit des Rezeptors Neuropilin-2 in der Fimbria/ Fornix, dem Stratum oriens und dem Stratum lacunosum moleculare⁴.

⁴ Diese Experimente wurden von Fr. Marion Lohrum, Frankfurt/Main, durchgeführt (Steup et al., 2000).

Aufgrund der Expressionsmuster von *Neuropilin-2* im Septum und von *Sema3C* im Hippokampus läßt sich die Hypothese aufstellen, daß *Sema3C* eine repulsive Barriere für septale Fasern darstellt, welche die Axone in der weißen Substanz entlang des Stratum oriens leitet bzw. die Terminationszone in CA1 und CA3 bildet. Zusätzliche attraktive Faktoren müssen jedoch vorhanden sein, um die septalen Fasern durch die repulsive Barriere in das Stratum radiatum zu leiten (Abb. 11B). *Tracer*-Studien mit DiI, die in fixierten Gehirnen von *Sema3C^{-/-}* Mäusen durchgeführt wurden, zeigten jedoch, daß die Abwesenheit von *Sema3C* keinen Einfluß auf die Terminierung von septalen Fasern in der inneren und äußeren Molekularschicht des Gyrus dentatus hatte (T. Skutella, unpublizierte Beobachtungen). Zusätzlich zu den Effekten auf septale Fasern besitzt *Sema3C* repulsive Eigenschaften auf Explantate aus der CA1-Region, in der dieser Faktor auch exprimiert wird (Abb. 11B). *Sema3C* könnte als repulsiver Faktor auf CA1-Neurone wirken und deren Axone in Richtung auf das Subiculum leiten. *Sema3F* wirkt in diesem System zusätzlich als repulsiver Faktor auf Axone aus der CA1- und der CA3-Region sowie auf Axone aus dem Gyrus dentatus (Chedotal et al., 1998). Es kann daher davon ausgegangen werden, daß mehrere Semaphorine ihre repulsiven Effekte auf die Fasern ausüben oder diese Semaphorine redundante Funktionen ausüben, um den Ausfall eines Faktors zu kompensieren (Chedotal et al., 1998).

4.2 Netrin-1 wirkt als attraktiver Faktor für Fasern der hippocampalen Kommissur

Die hippocampale Kommissur entspringt ipsilateral in zwei Regionen und projiziert auf die kontralaterale Seite. Die Mooszellen im Hilus des Gyrus dentatus projizieren über die hippocampale Kommissur in die innere Molekularschicht des kontralateralen Gyrus dentatus, während Neurone aus der CA3-Region in die CA1- und CA3-Regionen des kontralateralen Hippokampus projizieren (Amaral and Witter, 1995). Die ontogenetische Verteilung der mRNAs des attraktiven Leitmoleküls *Netrin-1* und seines Rezeptors, *DCC* läßt sich mit der Ausbildung der hippocampalen Kommissur in Übereinstimmung bringen und entspricht der Expression dieser mRNAs im adulten Hippokampus (Colicos et al., 1997; Volenec et al., 1997). In der Fimbria des Hippokampus wurde die Expression von *Netrin-1* früh in der Ontogenese beschrieben (Chedotal et al., 1998). In der vorliegenden Untersuchung war es möglich, *Netrin-1* mRNA zwischen E19 und P8 auch in den Zielgebieten der hippocampalen kommissuralen Fasern in CA1, CA3 und dem DG zu detektieren. *DCC* wird im DG/Hilus sowie in den Pyramidelzellen der CA3-Region exprimiert (Abb. 8). In den funktionellen Kokulturstudien konnte ein attraktiver Effekt von Netrin-1 auf Explantate aus DG und CA3 (Abb. 9), deren Fasern der Ursprung der hippocampalen Kommissur sind, nachgewiesen werden. Studien an *Netrin-1*- und *DCC*-defizienten Mäusen zeigen zudem selektive, aber schwere Defekte in der Ausbildung verschiedener kommissuraler Fasern (Serafini et al., 1996; Fazeli et al., 1997). Sowohl das Corpus callosum als auch die hippocampale Kommissur fehlen vollständig in den homozygoten Mutanten. Die Fimbria und die anteriore Kommissur sind ebenfalls in ihrer Entwicklung gestört (Serafini et al., 1996; Fazeli et al., 1997). Zusammengekommen unterstützen diese

Daten die Hypothese, das Netrin-1 und DCC an der Attraktion von kommissuralen Gyrus dentatus-/ Hilus- und CA3-Fasern in ihre Terminationszone im kontralateralen Hippokampus beteiligt sind.

4.3 Ein komplexes Netzwerk von neuronalen Leitmolekülen ist für die Entwicklung hippocampaler Projektionen verantwortlich

Während der Entwicklung der hippocampalen Projektionen sowie der intrahippokampalen Verschaltungen wird eine Vielzahl von Genen verschiedener Familien exprimiert, die als neuronale Leitmoleküle wirken. Die Resultate der vorliegenden Arbeit unterstützen die Vorstellung, daß sezernierte Klasse 3 Semaphorine sowie Netrin-1 als neuronale Leitmoleküle während der Entwicklung des zentralen Nervensystems wirken. In dieser Arbeit wurde der Einfluß dieser Moleküle auf die Entwicklung von afferenten Systemen in den Hippokampus der Ratte sowie auf intrahippokampale Projektionen nachgewiesen. Die sezernierten Klasse 3 Semaphorine Sema3A und Sema3C wirken als repulsive Moleküle und bilden repulsive Barrieren für verschiedene afferente Projektionen in den Hippokampus (Chedotal et al., 1998; Steup et al., 1999; Steup et al., 2000). Die Entwicklung des Tractus perforans und des Moosfasersystems wird durch Sema3A und dessen Rezeptor Neuropilin-1 beeinflusst, während Sema3C und Neuropilin-2 das Einwachsen der septo-hippocampalen Axone kontrollieren (Abb. 11).

Abb. 11 (übernächste Seite): Die Entwicklung von Projektionen in der hippocampalen Formation wird durch neuronale Leitmoleküle reguliert.

(A) Entorhinale Fasern der Schichten II und III projizieren durch den Tractus perforans in die äußere Molekularschicht des Gyrus dentatus und durch den Alveus in das Stratum lacunosum moleculare in

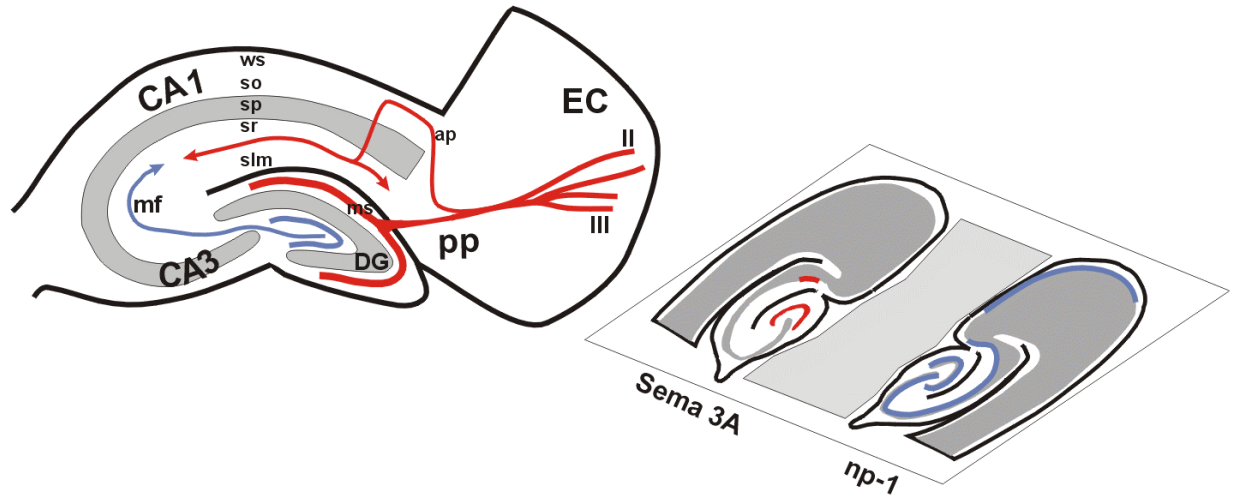
die CA1-Region. Durch die repulsive Wirkung von Sema3A werden die Fasern des Tractus perforans in ihrem weiteren Auswachsen gehindert und etablieren synaptische Kontakte in der Zielregion. Sema3A wird zusätzlich an der Grenze zwischen Subiculum und CA1 exprimiert, wo es möglicherweise die entorhinalen Fasern, die durch den Alveus wachsen, in die Richtung des Stratum pyramidale ablenkt. Die Projektion der Moosfasern entsteht in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus und wächst nach CA3. Die Fasern dieser Projektion können durch Sema3A, das in der Körnerzellschicht exprimiert wird, kollabiert werden. Damit stellt diese Schicht eine repulsive Barriere für die Moosfasern dar. Expression des Sema3A-Rezeptors *Neuropilin-1* findet sich in den Regionen, in denen der Tractus perforans sowie die Moosfaserprojektionen entstehen (linke Seite: Schema des Tractus perforans und der Alveus-Projektion [rot] sowie der Moosfasern [blau]; rechte Seite: Expression von *Sema3A* [in rot] und *Neuropilin-1* [in blau]).

(B) Fasern aus dem medialen Septum projizieren entlang der Fimbria, der weißen Substanz und des Stratum radiatum des Hippokampus. *Sema3C* wird in der Cornu ammonis-Region exprimiert und produziert eine repulsive Barriere, um diese Fasern entlang der CA-Region zu leiten. Die Expression von *Sema3C* findet sich ebenfalls in der Terminationszone der septalen Fasern, dem Gyrus dentatus. Der Sema3C-Rezeptor *Neuropilin-2* wird im medialen Septum exprimiert. Zusätzlich findet sich die Expression des Rezeptors in den Terminationszonen der septalen Fasern im Hippokampus, der CA-Region und dem Gyrus dentatus (linke Seite: Schema der septo-hippokampalen Projektionen [rot]; rechte Seite: Expression von *Sema3C* [in rot] und *Neuropilin-2* [in blau]).

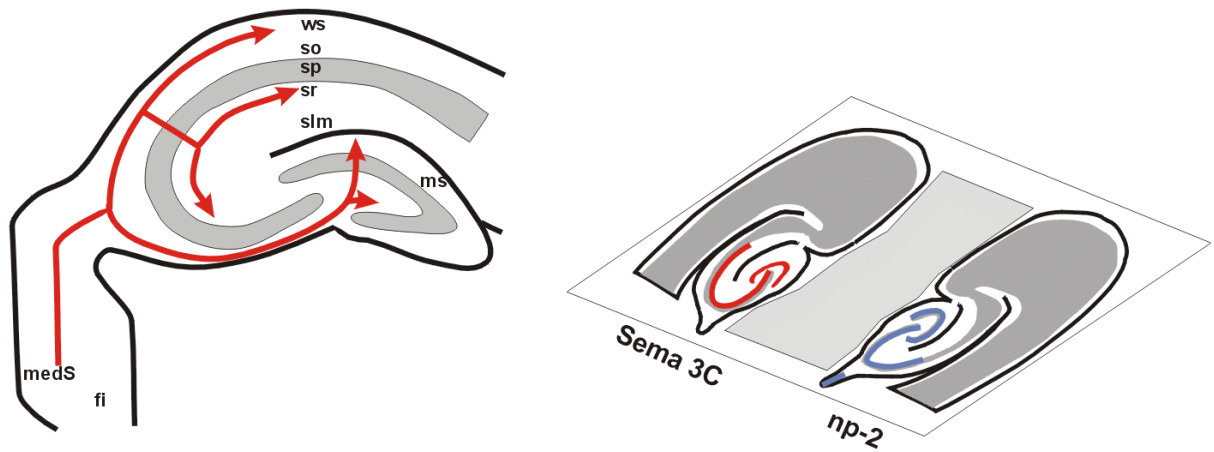
(C) Die kommissuralen Fasern projizieren über die Fimbria in das Stratum oriens und das Stratum radiatum der Cornu ammonis-Region, sowie in die innere Molekularschicht des Gyrus dentatus. *Netrin-1* wird in der Cornu ammonis-Region und im Gyrus dentatus exprimiert und könnte daher als attraktiver Faktor für diese Projektionen dienen. Der Netrin-1-Rezeptor *DCC* wird sowohl in den Ursprungsgebieten der kommissuralen Projektionen als auch in den Zielregionen, der Cornu ammonis-Region und dem Gyrus dentatus, exprimiert. (linke Seite: Schema der kommissuralen Projektionen [rot]; rechte Seite: Expression von *Netrin-1* [in rot] und *DCC* [in blau]).

ap = Alveus-Projektion; CA1/3 = Cornu ammonis; DCC = *deleted in colorectal cancer*; DG = Gyrus dentatus; EC II/III = entorhinaler Kortex, Schichten II/III; fi = Fimbria; mf = Moosfasern; ms = Molekularschichten; medS = mediales Septum; np1/-2 = *neuropilin-1/2*; pp = Tractus perforans; slm = Stratum lacunosum moleculare; so = Stratum oriens; sp = Stratum pyramidale; sr = Stratum radiatum; ws = weiße Substanz.

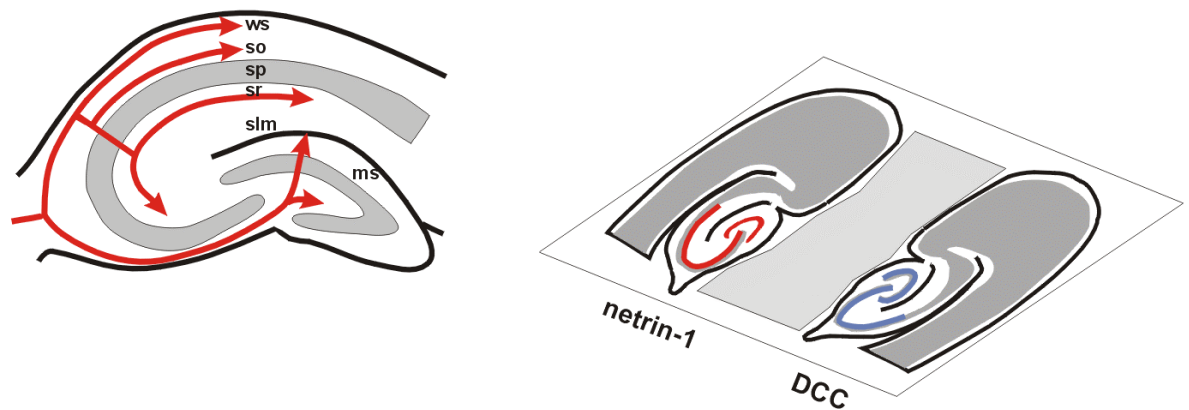
A entorhinale / Moosfaser-Projektionen



B septo-hippokampale Projektion



C kommissurale Projektionen



Netrin-1 besitzt, im Gegensatz zu den Semaphorinen, attraktive Eigenschaften und wirkt als Leitmolekül für die kommissuralen Fasern (Abb. 11). Daten aus *Sema3A*-, *Sema3C*- und *Netrin-1*-defizienten Tieren zeigten, daß, zusätzlich zu den hier untersuchten Molekülen, noch weitere Faktoren an der Ausbildung der hippokampalen Formation beteiligt sein müssen (Serafini et al., 1996; Steup et al., 2000). Dies wird durch Befunde unterstützt, die zeigen, daß außer den sezernierten Semaphorinen noch weitere membranständige Vertreter dieser Familie während der Ontogenese im Hippokampus exprimiert werden (*Sema4B*, *Sema5A* und *Sema5B*). Diese sind alle früh im Neuroepithelium vorhanden. Sie zeigen im Laufe der Entwicklung, während der Hippokampus seine charakteristische Morphologie annimmt, distinkte, z.T. überlappenden Expressionsdomänen (Mark et al., 1997; Skalióra et al., 1998). Semaphorin *Sema4A* wird postnatal ab P2 sowohl in CA1 wie auch CA3 exprimiert. *Sema5A* wird dagegen schon um E19 im Gyrus dentatus exprimiert, ab P0 auch in CA1 sowie der Grenze zwischen CA1 und dem Subikulum (Skalióra et al., 1998). Einen weiteren wichtigen Faktor in der hippokampalen Entwicklung und seiner Laminierung stellen die Cajal-Retzius-Zellen dar, die Reelin exprimieren (Frotscher et al., 1997; Del Rio et al., 1997). Reelin wird ebenfalls in den Cajal-Retzius-Zellen des Kortex exprimiert. In *Reeler*-Mutanten, denen Reelin fehlt, ist die Anordnung neokortikaler Zellen gestört, was darauf hindeutet, daß Reelin für die normale Entwicklung der kortikalen Laminierung eine wichtige Rolle spielt. Die Kortex-Laminierung entsteht durch die Wanderung von neu gebildeten Neuronen durch ältere Schichten hindurch nach außen (*inside-out*). Dort befinden sich Cajal-Retzius-Zellen, deren Reelin als Stoppsignal für früh während der Laminierung gebildete Neuronen dient. Dies verhindert, daß diese Neurone die Pia erreichen. In der weiteren Entwicklung wandern weitere Neurone durch diese

Schicht hindurch, erhalten durch Reelin ein Stoppsignal und beginnen synaptische Kontakte auszubilden. In der *Reeler*-Mutanten, denen Reelin fehlt, erreichen die frühen Neurone jedoch die Pia und differenzieren sich dort. Später gebildete Neurone können sich nun ausschließlich weiter innen differenzieren, wodurch eine umgekehrte Laminierung des Kortex (*outside-in*) zustande kommt (Stanfield and Cowan, 1979; Frotscher et al., 1997). Während der Entwicklung der hippocampalen Formation wird Reelin in den Cajal-Retzius-Zellen des Gyrus dentatus sowie in den Schichten I und II des entorhinalen Kortex exprimiert (Borrell et al., 1999). Die entorhinal-hippocampale Projektion wird auch in Abwesenheit von Reelin ausgebildet, wobei die Fasern auch in den korrekten Schichten des Hippokampus terminieren. Als Vorlage für die entorhinalen Fasern dient hierbei möglicherweise die frühe hippocampal-entorhinale Projektion, die um E17 herum von den Cajal-Retzius-Zellen gebildet wird (Ceranik et al., 1999). Dennoch werden einige Abnormalitäten in diesem System beobachtet, z.B. die Ausbildung einer Projektion des medialen entorhinalen Kortex in das Stratum radiatum und Stratum oriens von CA2 oder die Abwesenheit der lateralen entorhinalen Projektion in das Stratum lacunosum moleculare von CA3 (Borrell et al., 1999). Außerdem sind die Kollateralen, die entorhinale Fasern im Gyrus dentatus ausbilden, nach der Blockierung von Reelin durch funktionelle Antikörper in Anzahl und Dichte reduziert (Del Rio et al., 1997). Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Entwicklung des Hippokampus, seiner Struktur sowie seiner Projektionen durch das Zusammenspiel verschiedener attraktiver, repulsiver und adhesiver Moleküle kontrolliert wird (Del Rio et al., 1997; Forster et al., 1998; Borrell et al., 1999; Steup et al., 2000).

5 Zusammenfassung

Die Semaphorine *Sema3A* und *Sema3C* sowie *Netrin-1* und deren Rezeptoren, die *Neuropiline* und *DCC* wurden in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich ihrer Expression und auf ihre funktionellen Eigenschaften bezüglich des Auswachsens von Axonen, die die intrinsischen und afferenten hippocampalen Projektionen bilden, untersucht.

Während die Expressionsmuster von *Sema3A* schon gut bekannt waren, wurde in der hier vorliegenden Arbeit die Expression des Rezeptors von *Sema3A*, *NP-1*, untersucht. *NP-1* wird von Embryonaltag E17 an im entorhinalen Kortex, dem Subiculum und der hippocampalen Anlage exprimiert. Es konnte eine starke postnatale Expression von *NP-1* in der CA3-Region und eine schwächere Expression in der CA1-Region, dem Gyrus dentatus und dem entorhinalen Kortex gezeigt werden. Außerdem wurden in dieser Arbeit die Expressionsmuster von *Sema3C* und *NP-2* genauer untersucht. Etwa zum Zeitpunkt der Geburt (P0) wurde *Sema3C* im Gyrus dentatus und im Cornu ammonis exprimiert. Der *Sema3C*-Rezeptor *NP-2* wurde zu diesem Zeitpunkt ebenso im Gyrus dentatus und CA3-Region, schwächer auch in der CA1-Region exprimiert. Es wurde keine Expression dieser beiden Faktoren im entorhinalen Kortex detektiert. In Kokulturstudien zwischen mit *Sema3A* bzw. *Sema3C* transfizierten Zellaggregaten und Explantaten aus den hippocampalen Subregionen wurden für spezifische Explantate ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Sekretion der Semaphorine und dem Auswachsen der jeweiligen Explantate in einer drei-dimensionalen Kollagenmatrix deutlich. *Sema3A* besitzt repulsive Eigenschaften auf Explantate aus dem Gyrus dentatus, den CA1- und CA3-Region sowie dem entorhinalen Kortex. In dem resultierenden Modell

beeinflusst die Sema3A-NP1-Interaktion das Einwachsen bzw. die Terminierung entorhinaler Fasern in der Molekularschicht des Gyrus dentatus, indem Sema3A eine repulsive Barriere für einwachsende Fasern darstellt. Diese Barriere wirkt auch für Moosfasern, so daß diese in Richtung der CA3-Region auswachsen. Sema3C besitzt repulsive Eigenschaften auf Fasern des medialen Septums und beeinflusst dadurch das Einwachsen dieser Fasern entlang der Cornu ammonis Region in den Hippokampus.

Weiterhin wurden in dieser Arbeit die Expressionsmuster von *Netrin-1* und *DCC* im Hippokampus sowie die funktionellen Eigenschaften von Netrin-1 untersucht. *Netrin-1* wird bereits zum Zeitpunkt E17 im Kortex exprimiert, konnte im Hippokampus jedoch erst ab dem postnatalen Entwicklungsstadium P1 detektiert werden. Während im Gyrus dentatus nur ein schwaches und im entorhinalen Kortex kein Signal gefunden werden konnte, wird *Netrin-1* stark in der Cornu ammonis Region exprimiert. Der Rezeptor *DCC* wird dagegen schon früher in der Embryonalentwicklung, ab E15, diffus in der hippokampalen Anlage exprimiert. Ab P1 lassen sich diese Signale im Gyrus dentatus und in den CA1-CA3-Regionen unterscheiden. Von den untersuchten Explantaten der hippokampalen Region zeigte Netrin-1 nur auf die Fasern von Gyrus dentatus und CA3, welche die hippokampale Kommissur bilden, einen attraktiven Wachstumseffekt. Dies bestätigt Erkenntnisse aus *Netrin-1*- und *DCC*-defizienten Tieren, in denen die hippokampale Kommissur aufgrund des fehlenden axonalen Leitmoleküls bzw. seines Rezeptors nicht ausgebildet wird.

LITERATURVERZEICHNIS

- Ackerman,S.L., Kozak,L.P., Przyborski,S.A., Rund,L.A., Boyer,B.B., and Knowles-BB (1997). The mouse rostral cerebellar malformation gene encodes an UNC-5-like protein. *Nature* 386, 838-842.
- Adams,R.H., Betz,H., and Püschel,A.W. (1996). A novel class of murine semaphorins with homology to thrombospondin is differentially expressed during early embryogenesis. *Mech. Dev.* 57, 33-45.
- Adams,R.H., Lohrum,M., Klostermann,A., Betz,H., and Püschel,A.W. (1997). The chemorepulsive activity of secreted semaphorins is regulated by furin-dependent proteolytic processing. *EMBO J.* 16, 6077-6086.
- Amaral,D.G. and Witter,M.P. (1995). Hippocampal formation. In *The Rat Nervous System*, G.Paxinos, ed. Academic Press), pp. 443-493.
- Bork,P. and Beckmann,G. (1993). The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins. *J. Mol. Biol.* 231 , 539-545.
- Borrell,V., Del Rio,J.A., Alcantara,S., Derer,M., Martinez,A., D'Arcangelo,G., Nakajima,K., Mikoshiba,K., Derer,P., Curran,T., and Soriano- E (1999). Reelin regulates the development and synaptogenesis of the layer-specific entorhino-hippocampal connections. *J. Neurosci.* 19, 1345-1358.
- Brenner,S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71-94.
- Cai,H. and Reed,R.R. (1999). Cloning and characterization of neuropilin-1-interacting protein: a PSD-95/Dlg/ZO-1 domain-containing protein that interacts with the cytoplasmic domain of neuropilin-1. *J. Neurosci.* 19, 6519-6527.

- Castellani,V., Chedotal,A., Schachner,M., Faivre-Sarrailh,C., and Rougon,G. (2000). TI - Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance [see comments]. *Neuron* 27, 237-249.
- Catalano,S.M., Messersmith,E.K., Goodman,C.S., Shatz,C.J., and Chedotal,A. (1998). Many major CNS axon projections develop normally in the absence of semaphorin III. *Mol. Cell Neurosci.* 11, 173-182.
- Ceranik,K., Deng,J., Heimrich,B., Lubke,J., Zhao,S., Forster,E., and Frotscher,M. (1999). Hippocampal Cajal-Retzius cells project to the entorhinal cortex: retrograde tracing and intracellular labelling studies. *Eur. J. Neurosci.* 11, 4278-4290.
- Chan,S.S., Zheng,H., Su,M.W., Wilk,R., Killeen,M.T., Hedgecock,E.M., and Culotti,J.G. (1996). UNC-40, a *C. elegans* homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), is required in motile cells responding to UNC-6 netrin cues. *Cell* 87, 187-195.
- Chedotal,A., Del Rio,J.A., Ruiz,M., He,Z., Borrell,V., de Castro,F., Ezan,F., Goodman,C.S., Tessier,L.M., Sotelo,C., and Soriano,E. (1998). Semaphorins III and IV repel hippocampal axons via two distinct receptors. *Development* 125, 4313-4323.
- Chen,H., Chedotal,A., He,Z., Goodman,C.S., and Tessier,L.M. (1997). Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III [published erratum appears in *Neuron* 1997 Sep;19(3):559]. *Neuron* 19, 547-559.
- Chen,H., He,Z., Bagri,A., and Tessier,L.M. (1998). Semaphorin-neuropilin

interactions underlying sympathetic axon responses to class III semaphorins. *Neuron* 21, 1283-1290.

Colamarino, S.A. and Tessier, L.M. (1995a). The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. *Cell* 81, 621-629.

Colamarino, S.A. and Tessier, L.M. (1995b). The role of the floor plate in axon guidance. *Annu. Rev. Neurosci.* 18, 497-529.

Colicos, M. A., Baranes, D., Aznar, S., Shatzmiller, R., Manitt, C., Swedlow, P., Kelly, M. E., McIntyre, D. C., Tessier, Lavigne M., Lowenstein, D. H., and Kennedy, T. E. Netrin Expression in the adult mammalian brain. *Society Neuroscience Abstracts* 23, 133.15. 1997.

Ref Type: Abstract

de la Torre, J.R., Hopker, V.H., Ming, G.L., Poo, M.M., Tessier, L.M., Hemmati, B.A., and Holt, C.E. (1997). Turning of retinal growth cones in a netrin-1 gradient mediated by the netrin receptor DCC. *Neuron* 19, 1211-1224.

Deiner, M.S., Kennedy, T.E., Fazeli, A., Serafini, T., Tessier, L.M., and Sretavan, D.W. (1997). Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia. *Neuron* 19, 575-589.

Del Rio, J.A., Heimrich, B., Borrell, V., Forster, E., Drakew, A., Alcantara, S., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., Derer, P., Frotscher, M., and Soriano, E. (1997). A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections [see comments]. *Nature* 385, 70-74.

Deller, T., Adelmann, G., Nitsch, R., and Frotscher, M. (1996). The alvear pathway of the rat hippocampus. *Cell Tissue Res.* 286, 293-303.

Fazeli,A., Dickinson,S.L., Hermiston,M.L., Tighe,R.V., Steen,R.G., Small- CG, Stoeckli,E.T., Keino,M.K., Masu,M., Rayburn,H., Simons,J., Bronson,R.T., Gordon,J.I., Tessier,L.M., and Weinberg,R.A. (1997). Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* 386, 796-804.

Feiner,L., Koppel,A.M., Kobayashi,H., and Raper,J.A. (1997). Secreted chick semaphorins bind recombinant neuropilin with similar affinities but bind different subsets of neurons in situ. *Neuron* 19, 539-545.

Fitzgerald,M., Kwiat,G.C., Middleton,J., and Pini,A. (1993). Ventral spinal cord inhibition of neurite outgrowth from embryonic rat dorsal root ganglia. *Development* 117, 1377-1384.

Förster,E., Kaltschmidt,C., Deng,J., Cremer,H., Deller,T., and Frotscher,M. (1998). Lamina-specific cell adhesion on living slices of hippocampus. *Development* 125, 3399-3410.

Frotscher,M., Heimrich,B., and Deller,T. (1997). Sprouting in the hippocampus is layer-specific. *Trends Neurosci.* 20, 218-223.

Frotscher,M. and Zimmer,J. (1983). Lesion-induced mossy fibers to the molecular layer of the rat fascia dentata: identification of postsynaptic granule cells by the Golgi-EM technique. *J. Comp Neurol.* 215 , 299-311.

Fujisawa,H., Kitsukawa,T., Kawakami,A., Takagi,S., Shimizu,M., and Hirata,T. (1997). Roles of a neuronal cell-surface molecule, neuropilin, in nerve fiber fasciculation and guidance. *Cell Tissue Res.* 290, 465-470.

Giger,R.J., Urquhart,E.R., Gillespie,S.K., Levensgood,D.V., Ginty,D.D., and Kolodkin,A.L. (1998). Neuropilin-2 is a receptor for semaphorin IV: insight into the

structural basis of receptor function and specificity [see comments]. *Neuron* 21, 1079-1092.

Goodman,C.S. (1996). Mechanisms and molecules that control growth cone guidance. *Annu. Rev. Neurosci.* 19, 341-377.

Goodman,C.S. and Shatz,C.J. (1993). Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell* 72 *Suppl*, 77-98.

Guthrie,S. and Pini,A. (1995). Chemorepulsion of developing motor axons by the floor plate. *Neuron* 14, 1117-1130.

Harris,R., Sabatelli,L.M., and Seeger,M.A. (1996). Guidance cues at the Drosophila CNS midline: identification and characterization of two Drosophila Netrin/UNC-6 homologs. *Neuron* 17, 217-228.

He,Z. and Tessier,L.M. (1997). Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 90, 739-751.

Hedgecock,E.M., Culotti,J.G., and Hall,D.H. (1990). The unc-5, unc-6, and unc-40 genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*. *Neuron* 4, 61-85.

Hedgecock,E.M. and Norris,C.R. (1997). Netrins evoke mixed reactions in motile cells. *Trends Genet.* 13, 251-253.

Heffner,C.D., Lumsden,A.G., and O'Leary,D.D. (1990). Target control of collateral extension and directional axon growth in the mammalian brain. *Science* 247, 217-220.

Hirata,T., Takagi,S., and Fujisawa,H. (1993). The membrane protein A5, a putative neuronal recognition molecule, promotes neurite outgrowth. *Neurosci. Res.* 17, 159-

Ishii,N., Wadsworth,W.G., Stern,B.D., Culotti,J.G., and Hedgecock,E.M. (1992). UNC-6, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Neuron* 9, 873-881.

Kawakami,A., Kitsukawa,T., Takagi,S., and Fujisawa,H. (1996). Developmentally regulated expression of a cell surface protein, neuropilin, in the mouse nervous system. *J. Neurobiol.* 29, 1-17.

Keino,M.K., Masu,M., Hinck,L., Leonardo,E.D., Chan,S.S., Culotti,J.G., and Tessier,L.M. (1996). Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 87, 175-185.

Kennedy,T.E., Serafini,T., de,l.T., Jr., and Tessier,L.M. (1994). Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78, 425-435.

Klostermann,A., Lohrum,M., Adams,R.H., and Püschel,A.W. (1998). The chemorepulsive activity of the axonal guidance signal semaphorin D requires dimerization. *J. Biol. Chem.* 273, 7326-7331.

Kobayashi,H., Koppel,A.M., Luo,Y., and Raper,J.A. (1997). A role for collapsin-1 in olfactory and cranial sensory axon guidance. *J. Neurosci.* 17, 8339-8352.

Kolodkin,A.L., Levengood,D.V., Rowe,E.G., Tai,Y.T., Giger,R.J., and Ginty,D.D. (1997). Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 90, 753-762.

Kolodkin,A.L., Matthes,D.J., and Goodman,C.S. (1993). The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 75, 1389-1399.

Kolodziej,P.A., Timpe,L.C., Mitchell,K.J., Fried,S.R., Goodman,C.S., Jan- LY, and Jan,Y.N. (1996). frazzled encodes a Drosophila member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance. *Cell* 87, 197-204.

Leonardo,E.D., Hinck,L., Masu,M., Keino,M.K., Ackerman,S.L., and Lavigne,M. (1997). Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC-5 are candidate netrin receptors. *Nature* 386, 833-838.

Leung,H.C., Spence,A.M., Stern,B.D., Zhou,Y., Su,M.W., Hedgecock,E.M., and Culotti,J.G. (1992). UNC-5, a transmembrane protein with immunoglobulin and thrombospondin type 1 domains, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Cell* 71, 289-299.

Lumsden,A.G. and Davies,A.M. (1986). Chemotropic effect of specific target epithelium in the developing mammalian nervous system. *Nature* 323, 538-539.

Luo,Y., Raible,D., and Raper,J.A. (1993). Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 75, 217-227.

Mark,M.D., Lohrum,M., and Püschel,A.W. (1997). Patterning neuronal connections by chemorepulsion: the semaphorins. *Cell Tissue Res.* 290, 299-306.

Messersmith,E.K., Leonardo,E.D., Shatz,C.J., Tessier,L.M., Goodman,C.S., and Kolodkin,A.L. (1995). Semaphorin III can function as a selective chemorepellent to pattern sensory projections in the spinal cord. *Neuron* 14, 949-959.

Ming,G., Song,H., Berninger,B., Inagaki,N., Tessier,L.M., and Poo,M. (1999). Phospholipase C-gamma and phosphoinositide 3-kinase mediate cytoplasmic signaling in nerve growth cone guidance. *Neuron* 23, 139-148.

Mitchell,K.J., Doyle,J.L., Serafini,T., Kennedy,T.E., Tessier,L.M., Goodman,C.S., and Dickson,B.J. (1996). Genetic analysis of Netrin genes in *Drosophila*: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. *Neuron* 17, 203-215.

Mueller,B.K. (1999). Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 351-388.

Püschel,A.W., Adams,R.H., and Betz,H. (1995). Murine semaphorin D/collapsin is a member of a diverse gene family and creates domains inhibitory for axonal extension. *Neuron* 14, 941-948.

Püschel,A.W., Adams,R.H., and Betz,H. (1996). The sensory innervation of the mouse spinal cord may be patterned by differential expression of and differential responsiveness to semaphorins. *Mol. Cell Neurosci.* 7, 419-431.

Ramón y Cajal,S. (1890). Sobre la aparición de las expansiones celulares en la médula embrionaria. *Gaceta Sanataria de Barcelona* 12, 413-419.

Ramón y Cajal,S. (1893). La rétine des vertébrés. *La cellule* IX, 119-258.

Raper,J.A. and Kapfhammer,J.P. (1990). The enrichment of a neuronal growth cone collapsing activity from embryonic chick brain. *Neuron* 4, 21-29.

Sato,M., Lopez,M.L., Heffner,C.D., and O'Leary,D.D. (1994). Action of a diffusible target-derived chemoattractant on cortical axon branch induction and directed growth. *Neuron* 13, 791-803.

Semaphorin Nomenclature Committee (1999). Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins. Semaphorin Nomenclature Committee. *Cell* 97, 551-552.

Serafini,T., Colamarino,S.A., Leonardo,E.D., Wang,H., Beddington,R., Skarnes,W.C., and Tessier,L.M. (1996). Netrin-1 is required for commissural axon

guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 87, 1001-1014.

Serafini,T., Kennedy,T.E., Galko,M.J., Mirzayan,C., Jessell,T.M., and Tessier,L.M. (1994). The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78, 409-424.

Shepherd,I., Luo,Y., Raper,J.A., and Chang,S. (1996). The distribution of collapsin-1 mRNA in the developing chick nervous system. *Dev. Biol.* 173, 185-199.

Shirasaki,R., Tamada,A., Katsumata,R., and Murakami,F. (1995). Guidance of cerebellofugal axons in the rat embryo: directed growth toward the floor plate and subsequent elongation along the longitudinal axis. *Neuron* 14, 961-972.

Skaliora,I., Singer,W., Betz,H., and Püschel,A.W. (1998). Differential patterns of semaphorin expression in the developing rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 10, 1215-1229.

Song,H., Ming,G., He,Z., Lehmann,M., McKerracher,L., Tessier,L., and Poo,M. (1998). Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides [see comments]. *Science* 281, 1515-1518.

Song,H.J. and Poo,M.M. (1999). Signal transduction underlying growth cone guidance by diffusible factors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 355-363.

Stanfield,B.B. and Cowan,W.M. (1979). The Development of the Hippocampus and Dentate Gyrus in Normal and Reeler Mice. *J. Comp Neur.* 185, 423-460.

Steup,A., Lohrum,M., Hamscho,N., Savaskan,N.E., Ninnemann,O., Nitsch,R., Fujisawa,H., Püschel,A.W., and Skutella,T. (2000). Sema3C and netrin-1 differentially affect axon growth in the hippocampal formation. *Mol. Cell Neurosci.* 15, 141-155.

Steup,A., Ninnemann,O., Savaskan,N.E., Nitsch,R., Püschel,A.W., and Skutella,T.

(1999). Semaphorin D acts as a repulsive factor for entorhinal and hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 11, 729-734.

Super,H. and Soriano,E. (1994). The organization of the embryonic and early postnatal murine hippocampus. II. Development of entorhinal, commissural, and septal connections studied with the lipophilic tracer DiI. *J. Comp Neurol.* 344, 101-120.

Takagi,S., Hirata,T., Agata,K., Mochii,M., Eguchi,G., and Fujisawa,H. (1991). The A5 antigen, a candidate for the neuronal recognition molecule, has homologies to complement components and coagulation factors. *Neuron* 7, 295-307.

Takahashi,T., Fournier,A., Nakamura,F., Wang,L.H., Murakami,Y., Kalb,R.G., Fujisawa,H., and Strittmatter,S.M. (1999). Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell* 99, 59-69.

Tamagnone,L., Artigiani,S., Chen,H., He,Z., Ming,G.I., Song,H., Chedotal,A., Winberg,M.L., Goodman,C.S., Poo,M., Tessier,L.M., and Comoglio,P.M. (1999). Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 99, 71-80.

Tessier,L.M. and Goodman,C.S. (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* 274, 1123-1133.

Tessier,L.M., Placzek,M., Lumsden,A.G., Dodd,J., and Jessell,T.M. (1988). Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system. *Nature* 336, 775-778.

Varela,E.A., Tucker,A., Püschel,A.W., and Guthrie,S. (1997). Motor axon subpopulations respond differentially to the chemorepellents netrin-1 and

semaphorin D. *Neuron* 18, 193-207.

Volenec,A., Bhogal,R.K., Moorman,J.M., Leslie,R.A., and Flanigan,T.P. (1997). Differential expression of DCC mRNA in adult rat forebrain. *Neuroreport* 8, 2913-2917.

Wadsworth,W.G., Bhatt,H., and Hedgecock,E.M. (1996). Neuroglia and pioneer neurons express UNC-6 to provide global and local netrin cues for guiding migrations in *C. elegans*. *Neuron* 16, 35-46.

Winberg,M.L., Noordermeer,J.N., Tamagnone,L., Comoglio,P.M., Spriggs,M.K., Tessier,L.M., and Goodman,C.S. (1998). Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. *Cell* 95, 903-916.

Zipp,F., Nitsch,R., Soriano,E., and Frotscher,M. (1989). Entorhinal fibers form synaptic contacts on parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat fascia dentata. *Brain Res.* 495, 161-166.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde von April 1997 bis Oktober 2000 am Institut für Anatomie der Charité, Universitätsklinikum der Humboldt-Universität zu Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. Robert Nitsch angefertigt. Hiermit danke ich Herrn Prof. Dr. Robert Nitsch für die freundliche Überlassung des Themas sowie der Arbeitsmöglichkeit im Institut.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Thomas Skutella, der meine Arbeit mit zahlreichen Anregungen und großem Interesse begleitete. Seine Unterstützung hat maßgeblich zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen. Außerdem möchte ich Herrn Dr. Olaf Ninnenmann danken, der jederzeit mit seinem Rat zur Verfügung stand sowie für die kritischen und hilfreichen Gespräche, die ich mit beiden führen konnte.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre, anregende Diskussionen und manche hilfreiche Hand möchte ich mich außerdem bei Frau Dr. Eva Simbürger, Frau Dr. Ying-Wen Chen, Herrn Dr. Martin Zintz, Herrn Eckart Stein, Frau Anna Klötting, Frau Sabine Winkler, Frau Dorit Haas und Frau Pia Herrmann sowie anderen, hier unerwähnt gebliebenen Mitgliedern des Instituts für Anatomie, bedanken. Ich danke Frau Dore Wachenschwanz und Frau Brigitte Mannsfeld für ihre hervorragende photographische Arbeit und graphische Arbeit. Bei Herrn Dr. Andreas Püschel, Frankfurt/ Main, möchte ich mich für die freundliche Überlassung der Semaphorin- und Netrin-cDNAs bedanken. Für das kritische Lesen des Manuskriptes danke ich Herrn Prof. Dr. Robert Nitsch, Herrn PD Dr. Thomas Skutella, Herrn Dr. Olaf Ninnenmann sowie Frau Dr. Eva Simbürger.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, ohne die mein Studium nicht möglich gewesen wäre und vor allem meiner Mariza, die mich die ganze Zeit in ihrer Liebe ertragen hat, auch als die Experimente nicht funktioniert haben.

LEBENS LAUF

Vorname, Name		Andreas Steup
Geburtsdatum		21.12.1970
Geburtsort		Berlin
Familienstand		verheiratet
Staatsangehörigkeit		deutsch
Ausbildung		
Schule	1977-1981	kath. Grundschule St. Marien
	1981-1990	Gymnasium Canisius-Kolleg
	1990	Abitur
Hochschule	1991-1997	Studium der Biologie an der Freien Universität Berlin Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie Thema: Abschluß: Diplom
	seit 01.04.1997	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Anatomie der Charité, Humboldt-Universität zu Berlin
	2001	Promotion zum Thema: Expression und Funktion neuronaler Leitmoleküle im Hippokampus

Eidestattliche Erklärung

Ich erkläre, daß ich diese Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe und daß alle Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinne nach anderen Werken entnommen sind, durch Angaben der Quellen als Entlehnung kenntlich gemacht worden sind.

Berlin, 2001

Andreas Steup